

Análisis de mutaciones en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* de aislados de *Helicobacter pylori* resistentes a Claritromicina y Amoxicilina, provenientes de Tumaco y Túquerres



FABIAN FELIPE FERNANDEZ DAZA Bsc

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
MAESTRIA EN CIENCIAS-BIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
Santiago de Cali
2013**

Análisis de mutaciones en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* de aislados de *Helicobacter pylori* resistentes a Claritromicina y Amoxicilina, provenientes de Tumaco y Túquerres



FABIAN FELIPE FERNANDEZ DAZA Bsc

Documento presentado para optar al título de maestría en Ciencias-Biología

ARMANDO DANIEL CORTEZ BUELVAS MD

DIRECTOR

GUILLERMO BARRETO RODRÍGUEZ PhD

CO-DIRECTOR

UNIVERSIDAD DEL VALLE

MAESTRIA EN CIENCIAS-BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Santiago de Cali

2013

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN
TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

Jurado conformado por los doctores:

LIDA INÉS MANCILLA ESTACIO, Universidad Santiago de Cali
ESTEBAN OSORIO CADAVID, Universidad del Valle

El día 11 de Julio de 2013 a las 3:00 p.m. se llevó a cabo la sustentación de la Tesis: **"Análisis de mutaciones en los genes 23S rRNA y pbp1A de aislados de Helicobacter pylori resistentes a Claritromicina y Amoxicilina, provenientes de Tumaco y Túquerres"**, presentada por el estudiante **Fabián Felipe Fernández Daza**, código 0903270, Plan 7180, candidato a grado para la próxima ceremonia.

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN:

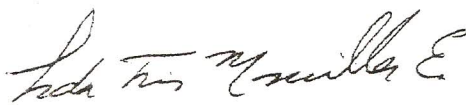
☒ APROBADA () MERITORIA () LAUREADA

Regístrese esta calificación.

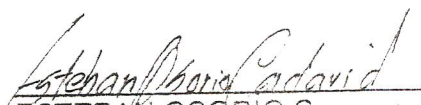
- () REPROBADA: El estudiante debe matricularse en esta actividad.
() PENDIENTE: El estudiante debe acoger las recomendaciones del jurado y presentar nuevamente el documento ante el Director de Tesis.
() Requiere () No requiere nueva sustentación.
El plazo para nueva sustentación y/o presentación del documento es de: _____

OBSERVACIONES

Santiago de Cali, 11 de Julio de 2013



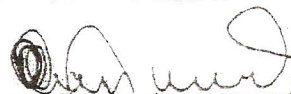
LIDA INÉS MANCILLA E.
Jurado



ESTEBAN OSORIO C.
Jurado



ARMANDO DANIEL CORTEZ B.
Director de Tesis



GUILLERMO BARRETO R.
Co Director de Tesis



ALBA MARINA TORRES G.
Coordinadora de la Sustentación
Directora Postgrado en Biología

DEDICATORIA

Expreso mi eterno agradecimiento a DIOS por mi existencia, Al Espíritu Santo por sus dones y el amor de Madre MARIA.

Dedico este trabajo a mi familia me apoyo en todo instante, a mis padres Hosmel Fernández y Carmen Daza y hermanos Darwin y Daniela

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a los doctores Armando Cortes y Guillermo Barreto quienes con sus correcciones y directrices permitieron culminar mi trabajo. A mis compañeros Mercedes Figueroa, Andrés Matta, Adrian Darío, Luz Estela y Javier Bustamante y el grupo del RPCC donde se realizó esta investigación.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 GENERALIDADES DE <i>H. pylori</i>	6
2.1.1 Características de <i>H. pylori</i>	7
2.1.2 Aislamiento primario de <i>H. pylori</i>	7
2.1.3 Factores de <i>H. pylori</i> involucrados en la colonización y adhesión en la mucosa gástrica	7
2.1.4 Factores de patogenicidad que contribuyen al daño de la mucosa gástrica.	9
2.2 PATOGÉNESIS.....	11
2.2.1 Papel de la respuesta inmune en la infección por <i>H. pylori</i>	13
2.3 TRATAMIENTO.....	14
2.3.1 Antimicrobianos utilizados para erradicar <i>H. pylori</i>	14
2.3.2 Métodos de evaluación de susceptibilidad <i>in-vitro</i> a antibióticos:	19
2.4 SECUENCIACION DE ADN POR EL MÉTODO Big Dye Terminator.	20
2.5 JUSTIFICACIÓN	22
2.6 HIPOTESIS	23
2.7 OBJETIVO GENERAL.....	24
3. METODOLOGÍA GENERAL.	25
3.1 Descripción y antecedentes de las poblaciones evaluadas.....	25
3.1.1 Población empleada para el estudio.	28
3.2 Cultivo y aislamiento de <i>H. pylori</i>	28
3.2.1 Cultivo inicial a partir de biopsia gástrica.....	28
3.2.2 Siembra del preservado	29
3.2.4 Identificación fenotípica de <i>H. pylori</i>	30
3.2.5 Extracción deADN	30
3.2.6 Amplificación del gen ureA.	31
3.2.6 Evaluación de la susceptibilidad de los aislados de <i>H. pylori</i> a claritromicina mediante el método de dilución en agar.....	31

3.2.7 Prueba de aliento [¹³ C]-Urea.	32
3.2.8 Análisis de secuencias.....	32
3.2.9 Análisis estadístico.....	33
4. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN EL DOMINIO V DEL GEN 23S <i>rRNA</i> EN AISLADOS DE <i>Helicobacter pylori</i> RESISTENTES A CLARITROMICINA PROVENIENTES DE LAS POBLACIONES DE TUMACO Y TÚQUERRES (NARIÑO -COLOMBIA).....	34
4.1 RESUMEN	34
3.2 INTRODUCCIÓN	35
4.3 OBJETIVO	37
4.4 METODOLOGÍA.....	37
4.4.1 Amplificación del domino V del gen 23S <i>rRNA</i> en <i>H. pylori</i>	37
4.4.2 Purificación de amplificandos.....	38
4.4.3 Secuenciación e identificación de mutaciones.	38
4.5 RESULTADOS	39
4.5.1 Población.....	39
4.5.2 Amplificación y secuenciación del dominioV del gen 23r <i>RNA</i> de <i>H. pylori</i> de aislados de Tumaco y Túquerres.	40
4.5.3 Análisis de mutaciones.....	41
4.5.5 Análisis de la relación entre la resistencia <i>in-vitro</i> y el fracaso de erradicación .45 <i>in-vivo</i> de <i>H. pylori</i>	45
4.5.6 Localización de las mutaciones en el gen 23S <i>rRNA</i>	46
4.6 DISCUSIÓN	48
4.6.1 Susceptibilidad <i>in- vitro</i> a claritromicina.....	48
4.6.2 Mutaciones y resistencia <i>in-vitro</i> a claritromicina.	50
3.8 LITERATURA CITADA	58
5. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN LOS DOMINIOS, <i>transglicosilasa</i> Y <i>transpeptidasa</i> DEL GEN <i>pbp1A</i> EN AISLADOS DE <i>Helicobacter</i> <i>pylori</i> RESISTENTES A AMOXICILINA DE PACIENTES PROVENIENTES DE LAS POBLACIONES DE TUMACO Y TÚQUERRES (NARIÑO–COLOMBIA)	66
5.1 RESUMEN	66
5.2 INTRODUCCIÓN	67

5.3 OBJETIVO	69
5.4 METODOLOGÍA	69
5.4.1 Amplificación de los dominios <i>transglicosilasa</i> y <i>transpeptidasa</i> del gen <i>pbp1A</i> en <i>H. pylori</i>	69
5.4.2 Aislamiento y purificación de amplificadores.....	70
5.4.3 Secuenciación e identificación de mutaciones	70
5.5 RESULTADOS	71
5.5.1 Población.....	71
5.5.2 Amplificación y secuenciación de los dominios <i>transglicosilasa</i> (<i>pbp1A-1</i>) y <i>transpeptidasa</i> (<i>pbp1A-2</i>), del gen <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i> de aislados de Tumaco.....	72
5.5.3 Amplificación y secuenciación de los dominios <i>transglicosilasa</i> (<i>pbp1A-1</i>) y <i>transpeptidasa</i> (<i>pbp1A-2</i>), del gen <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i> de aislados de Túquerres.....	78
5.6 DISCUSIÓN	86
5.6.1 Prevalencia de la resistencia a amoxicilina	86
5.6.2 Mutaciones en el gen <i>pbp1A</i> y la resistencia amoxicilina	88
5.7 CONCLUSIONES	93
5.8 LITERATURA CITADA	94
6. DISCUSIÓN.....	99
7. CONCLUSIONES.....	104
8. PERSPECTIVAS	105
9. LITERATURA CITADA.....	106
Anexo A. Pruebas de identificación para <i>H.pylori</i>	124
Anexo B. Estudios de susceptibilidad de <i>H.pylori</i> a amoxicilina y claritromicina 2000-2013	127
Anexo C. Investigaciones de mutaciones en el gen <i>23S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> y resistencia a claritromicina periodo 2000-2013.	129

RESUMEN

La infección por *H. pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer gástrico (tipo intestinal). La erradicación de la bacteria empleando la terapia triple (amoxicilina+claritromicina+omeprazol) disminuye y cura estas lesiones precancerosas; sin embargo la resistencia los antibióticos encontrada en la bacteria reduce el éxito del tratamiento. La resistencia a claritromicina y amoxicilina se asocia a mutaciones en los genes *23S RNA* y *pbp1A* respectivamente. En Colombia son escasos los estudios que caracterizan las mutaciones en estos genes y su relación con la resistencia a los antibióticos en poblaciones con contraste de riesgo de cáncer.

Objetivo: determinar la posible asociación entre mutaciones puntuales en los genes *23S rRNA* (domino V) y *pbp1A* (dominios transglicosilasa y transpeptidasa), y la resistencia *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina respectivamente en aislados de *H. pylori* de pacientes con gastritis crónica provenientes de dos poblaciones con contraste en el riesgo de cáncer gástrico, Tumaco (bajo riesgo) y Túquerres (alto riesgo).

Metodología: se evaluó la resistencia a amoxicilina y claritromicina por el método de Dilución en Agar en 147/149 aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres. Se amplificaron por PCR y secuenciaron 76 aislados para el gen *23S rRNA* y 71 para el gen *pbp1A*, se estimó la frecuencia de las mutaciones y su asociación con el fracaso de erradicación medido por la prueba de aliento [¹³C]-Urea.

Resultados: se encontraron 8 y 5 aislados resistentes para amoxicilina/claritromicina, respectivamente en la población de Túquerres; el 57% (33/54) de las secuencias del gen *23S rRNA* presentaron mutaciones. Se reportan las mutaciones T2183C, C2196T, A2144G, A1593T, A1653G, C1770T, C1954T, G1827, C1770T, C1954T, y G1827C, presentes únicamente en aislados resistentes *in-vitro* a claritromicina. Para el gen *pbp1A* se encontraron las mutaciones A69V, K619T, N608S, T511A, T556S, T586M, M497H, I552V, I563T, I547T, A611S, T593S, S638T, L494F, X594G,

X595G, X596S y V601A solo en aislados de *H. pylori* resistentes a la amoxicilina, no se observó asociación entre las mutaciones y el fracaso terapéutico.

Conclusiones: aunque se observaron mutaciones puntuales en los genes *pbp-1A* y *23S rRNA* no fue posible establecer asociación con la resistencia *in-vitro*, se requiere evaluar el rol de las mutaciones descritas por primera vez en la resistencia a estos antimicrobianos.

Palabras claves: cáncer gástrico, resistencia antimicrobiana, triple terapia.

ABSTRACT

H. pylori infection is the main risk factor for the gastric cancer precursor lesions development (intestinal type). The eradication of bacteria using triple therapy (amoxicillin + clarithromycin + proton pump inhibitor) decreases and cure these precancerous lesions and the increase in resistance to clarithromycin and amoxicillin is associated with mutations in *23S rRNA* and *pbp1A* respectively. In Colombia there are few studies that have characterized mutations in these genes and its relation to antibiotic resistance in populations with contrasting cancer risk.

Goals: To determine the possible association between mutations in the *23S rRNA* genes (domain V) and *pbp1A* (transglycosylase and transpeptidase domains); and resistance to clarithromycin and amoxicillin in *H.pylori* isolated by gastritis patients from two populations of Tumaco (low risk) and Túquerres (high risk) at contrasting risk for gastric cancer.

Methodology: We evaluated the resistance to amoxicillin and clarithromycin (agar dilution) in 147 *H.pylori* isolates from Túquerres population. Seventy six *23S rRNA* gene and 71 *pbp1A* gene isolates were amplified by PCR and sequenced. We estimated the mutations frequency and the breath test [13C]-Urea was used to measure their association with failure of eradication.

Results: Túquerres population showed 8 and 5 isolates resistant to amoxicillin / clarithromycin, respectively. *23S rRNA* gene sequences showed 57% (33/54) of mutations. We report the *23S rRNA* gene mutations in clarithromycin isolates resistant in vitro at T2183C, C2196T, A2144G, A1593T, A1653G, C1770T, C1954T, G1827, C1770T, C1954T and G1827C.

On the other hand, *pbp1A* gene mutations were found at A69V, K619T, N608S, T511A, T556S, T586M, M497H, I552V, I563T, I547T, A611S, T593S, S638T, L494F, X594G,

X595G, X596S and V601A in *H. pylori* isolates resistant to amoxicillin only. No associations were observed between mutations and treatment failure.

Conclusions: In spite of punctual mutations were observed in *23S rRNA* and *pbp1A* genes, were not possible to establish association with resistance in vitro. We recommend evaluating the mutations role described the first time in resistance to these antibiotics.

Keywords: Gastric cancer, Antimicrobial resistance, Triple therapy.

2. INTRODUCCIÓN

En el año 2.008 fueron reportados 12.662.554 casos de cáncer en el mundo, de estos el 7.8% (988.602 casos) correspondieron a cáncer gástrico, siendo el quinto tipo de cáncer más frecuente; en este mismo periodo se reportaron 737.419 muertes por esta misma neoplasia en el mundo. Esta patología es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (Globocan (a) 2008), ocurriendo la mayoría de los casos en países en vía de desarrollo (Ferlay et al, 2008). En Colombia el cáncer gástrico presenta una prevalencia de 10.1 /100.000 habitantes de ambos sexo (por año) siendo la primera causa de muerte por cáncer, con 5073 casos, y el segundo cáncer en incidencia con 6.635 casos para el año 2.008 (Globocan (b) 2008). El riesgo de cáncer gástrico varía asociado a zonas geográficas; en las zonas andinas el riesgo es 2.1 y de 0.47 para las zonas costeras (Camargo et al, 2004).

Esta patología es de origen multifactorial y con una tasa de supervivencia de menos del 20% a 5 años en pacientes sometidos a gastrectomía con diagnóstico tardío (Correa,2011). La difusión temprana de la enfermedad limita los efectos terapéuticos de la cirugía, a excepción de los pacientes en etapas tempranas del tumor con una supervivencia a 5 años mayor al 90%. El cáncer gástrico ha sido clasificado en difuso e intestinal, el primero es de difícil diagnóstico y el más frecuente en zonas debajo riesgo; el tipo intestinal es más frecuente en varones de edad avanzada que viven en zonas de alto riesgo considerándose de tipo epidémico (Otero et al, 2009)

Se han descrito diversos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, entre los cuales la infección por *H. pylori* (Marshall et al, 1985; Goodwin et al, 1989), se ha considerado como el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (Blaser y Atherton 2004); y clasificado como carcinógeno tipo I por la OMS en 1994 (IARC, 1994). Otros factores asociados al desarrollo de cáncer gástrico incluyen las dietas ricas en carnes rojas, la ingesta de condimentos irritantes (pimienta), el exceso de sal, el consumo de alimentos ahumados y/o preparados con vinagre (D'Elia et al, 2012), el consumo de tabaco (ACS, 2012; Forman y Burley 2006) y la obesidad (Yang et al,2009). El género y la edad son también factores de riesgo, siendo el cáncer gástrico más prevalente en hombres

(IARC, 2008) y en mayores de 50 años (ACS, 2012). También se han considerado entre los factores de riesgo ciertas patologías como: el linfoma del estómago (Kelley y Duggan, 2003), la anemia perniciosa (Kelley y Duggan, 2003; Catalano et al, 2005) la enfermedad de Menetrier (gastropatía hipertrófica) (Jiménez y Estevez 1998), el cáncer gástrico difuso hereditario (Otero et al, 2009; Chen et al, 2011), y la infección por el virus Epstein-Barr (Kelley y Duggan, 2003).

2.1 GENERALIDADES DE *H. pylori*

Esta bacteria descrita por primera vez en el año de 1981 por Marshall y Warren. En la actualidad se estima que coloniza más de la mitad de la población mundial (Blaser y Atherton 2004), donde la infección ocurre en la infancia, y mayormente en individuos que viven en condiciones precarias de vida y hacinamiento (Stone et al, 1998; Vela y Vitor, 2010). Las principales vías de transmisión de la infección son: las vías fecal-oral, oral-oral y gastro-oral (Dowsett et al, 1999; Murray et al, 2005; Ahmed et al, 2006). Se presume que en infantes la mayor vía de la infección es fecal-oral. En condiciones de hacinamiento y precarias de vida; la infección puede persistir a lo largo de la vida, pudiendo generar lesiones precancerosas y finalmente el cáncer gástrico, si no es detectado a tiempo y tratado de forma oportuna. Cuando la infección ocurre por primera vez en adultos causa gastritis con hipoclorhidria, malestar gástrico y náuseas (Graham et al, 1988; Blaser y Atherton, 2004).

Se ha observado que la mayoría de los países en vía de desarrollo tienen una prevalencia de la infección por *H. pylori* de hasta un 90% o más, con cerca del 50% de la población infectada a los 10 años de edad (Bravo et al, 2003), así la prevalencia de la infección por *H.pylori* en Colombia es muy alta en todo el país, como por ejemplo: Bogotá; en Tunja y Manizales donde la prevalencia de la infección es de 99.1% y 85.5% respectivamente, Túquerres (85.4%), Tumaco (88.7%) (Cortez et al, 2012)

2.1.1 Características de *H. pylori*.

H. pylori es un bacilo gramnegativo, de entre 0.5 a 1 micra de ancho, y 3 micras de largo, posee de 2 a 6 flagelos monopolares, y crece en ambientes microaerófilos. Su morfología característica es espiral, sin embargo puede observarse en forma cocoide en condiciones no favorables para su crecimiento. (Amieva y El-omar, 2008).

La temperatura óptima de crecimiento para *H. pylori* es 37 °C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35 a 39 °C en microaerofilia. Para su cultivo se requieren medios suplementados con suero o sangre entre el 5% y 10%, los cuales actúan como fuentes adicionales de nutrientes; usualmente se emplean con más frecuencia para su cultivo los medios sólidos Agar Mueller-Hinton y Agar Columbia, sin embargo puede ser cultivada en medios líquidos donde se logra con menor dificultad a partir de caldo de *Brucella*, infusión cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soja, todos ellos suplementados con nutrientes (Mégraud, 1995)

2.1.2 Aislamiento primario de *H. pylori*

En el aislamiento primario, el objetivo de evitar el sobrecrecimiento de contaminantes que pueden acompañar a *H. pylori* en la biopsia, para lo cual se adicionan inhibidores al medio de cultivo que no afectan la viabilidad de la bacteria. Entre estos se encuentran las mezclas de antibióticos como el suplemento de Dent, que contiene vancomicina, trimetoprima, cefsoludina y anfotericina B. Adicionalmente se requiere recrear un ambiente atmosférico ideal, este ambiente microaerófilico presenta las siguientes características: 5-10% de O₂, 5-10% de CO₂ y 80-90% de N₂ a 35-37°C, una humedad del 90-95% y una incubación de hasta 10 días antes de considerar negativo el cultivo. (Andersen y Wadström, 2001)

2.1.3 Factores de *H. pylori* involucrados en la colonización y adhesión en la mucosa gástrica

Entre los diversos factores en *H. pylori* involucrados en la colonización de la mucosa gástrica, se diferencian aquellos asociados al daño tisular y los asociados a la supervivencia de la bacteria. Actualmente se considera que los flagelos, la ureasa, y adhesinas son factores esenciales en colonización de la mucosa gástrica, ya los mutantes de *H. pylori* para estas

características son incapaces de colonizar la mucosa gástrica en animales de laboratorio. (Andersen y Wadström, 2001)

2.1.3.1 Flagelos y motilidad

La morfología en espiral y los flagelos polares, le permiten a *H. pylori* penetrar en la capa de mucina, y tiende a incrementar su actividad cuando la viscosidad del medio es mayor, y se reduce en ambientes con pH inferior a 4. (Andersen y Wadström, 2001).

2.1.3.2 Ureasa

La ureasa es una de las enzimas clave en la patogénesis de *H. pylori*. Tiene un peso molecular de 550 kDa y se compone de tres subunidades de 26,5 kDa (Ure A), 61 kDa (Ure B), y 13 kDa (Ure C). La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono; creando un microambiente de pH neutro (pH 6-7) alrededor de la bacteria, permitiéndole la supervivencia en el medio ácido del estómago y su migración al epitelio gástrico. Al alcanzar la superficie de las células de la mucosa o en un medio con pH 6-7, se inactiva el transportador *UreI* en la membrana, que permite la entrada de la urea al citoplasma de la bacteria, inhibiendo así su hidrólisis. (Andersen y Wadström, 2001)

El amonio producido a partir de la hidrólisis de la urea, induce necrotización del tejido profundo; colaborando en el desarrollo de gastritis atrófica crónica y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis. (Bauerfeind et al, 1997)

2.1.3.3 La superóxido dismutasa y catalasa

En el proceso infeccioso de *H. pylori* se presenta una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, por lo cual la bacteria presenta la enzima superóxido dismutasa que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno a partir del superóxido producido por estos polimorfonucleares y macrófagos. Este peróxido de hidrógeno es sustrato de la catalasa, que le descompone en agua y oxígeno. (Andersen y Wadström, 2001)

2.1.3.4 Adhesinas

La adherencia a las células epiteliales gástricas es un prerrequisito para la colonización del

estómago por *H. pylori* evitando la erradicación, vía el intercambio de la mucosa y el peristaltismo gástrico. Se requiere el contacto íntimo con las células epiteliales para que se ejerzan los efectos patogénicos producidos por *H. pylori* en la mucosa gástrica, como son cambios morfológicos e inducción de una respuesta inflamatoria. (Beswick 2006).

Entre las adhesinas estudiadas se encuentran: HpaA (*Helicobacter pylori adhesin A*) que media la unión a glicoconjugados con ácido siálico (N-acetil-neuraminil-lactosa) presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y en los neutrófilos (Nvström y Svennerholm, 2007); la adhesina BabA (*blood antigen binding adhesion*): se une a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis (Wirth et al, 2006); la adhesina SabA (*sialic acid binding adhesion*): se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa (Unemo, 2005). OipA (*outer membrane inflammatory protein*): todas las cepas poseen el gen que codifica para esta adhesina, pero sólo algunas la expresan. Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8, aunque no se sabe cuál es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas cagA (Yamoka 2008).

2.1.4 Factores de patogenicidad que contribuyen al daño de la mucosa gástrica.

2.1.4.1 Citotoxina vacuolizante (VacA).

La proteína VacA es una toxina codificada por el gen vacA, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y muerte celular. En el citosol interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas.

El gen vacA es polimórfico, principalmente en la región del péptido señal, donde puede tener los subtipos s1a, s1b, s1c y s2, y en la región media, los genotipos m1 o m2 (Cover y Blanke, 2005). La actividad vacuolizante es mayor en los alelos s1m1 que en los s1m2 y no se encuentra en los genotipos s2m2 (Atherton et al, 1995). Se ha encontrado que existe una

asociación entre la producción de VacA y el daño en el tejido, ciertos genotipos de vacA como s1m1 con alta actividad vacuolizante se correlacionan con padecimientos más graves en el humano (Atherton et al 1995), como úlcera péptica y cáncer gástrico, mientras que el genotipo s2 se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con gastritis (Jiménez et al, 2013)

2.1.4.2 Citotoxina asociada al Gen A (CagA)

Este gen forma parte de la isla de patogenicidad Cag (cagPAI), la cual tiene un tamaño de 37 a 40 kb y está flanqueada por secuencias repetidas directas (*direct repeats*) de 31 pb. Su contenido G + C es del 35% en contraste con el 39% del cuerpo del genoma. Muchos genes de virulencia de la cagPAI no se expresan constitutivamente, sino que responden a señales ambientales.

La cagPAI *H. pylori* codifica un sistema de secreción de proteínas tipo IV que inyecta CagA y peptidoglicanos en las células epiteliales del hospedero. La translocación de cagA depende de la presencia de un canal de urea protón-dependiente UreI. Ante un descenso de pH, cagA se mueve del centro a la porción periférica del citoplasma. La diana molecular de CagA más estudiada es una fosfatasa SHP-2 (*proteín tyrosine phosphatase*) que al ser activada puede contribuir a la proliferación celular excesiva.

La CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación proviene de la presencia de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo carboxilo-terminal y puede influir en la patogenicidad de las distintas cepas cagA+ debido a que la variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SHP-2, y por tanto una distinta activación. La secuencia aminoacídica que se repite es GLU-PRO-ILE-TYR-ALA denominada “*EPIYA motif*”. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos los EPIYA reciben diferente nomenclatura: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D. Hay estudios en los que se encuentra que la proteína CagA que contiene EPIYA-A y EPIYA-B, seguidas por repeticiones de EPIYA-C es más frecuente en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes occidentales, mientras que el EPIYA-D lo es en cepas aisladas en pacientes asiáticos.

La proteína CagA translocada aumenta la producción de IL-8. Así mismo, los productos de la cagPAI están asociados con un aumento de la producción de otras citoquinas como la IL-1b, TNF- α y del factor nuclear de transcripción NF κ B, que favorecen un ambiente inflamatorio (Serrano et al, 2009)

2.2 PATOGÉNESIS

El proceso de carcinogénesis gástrica de tipo intestinal ha sido explicado mediante el modelo de Correa, el cual considera que el cáncer gástrico es el resultado final de la interacción de la infección por *H. pylori*, con diversos factores como: el consumo de sustancias irritantes para la mucosa gástrica, factores ambientales y del hospedero que interactúan en diferentes etapas del proceso canceroso (Correa, 1992 citado por Serrano et al, 2009). Esta patología se inicia con aparición de la gastritis superficial, que posteriormente avanza a gastritis crónica atrófica y que se inicia en la región antral y asciende hacia el cuerpo, disminuyendo la producción de ácido clorhídrico (hipoclorhidria). La hipoclorhidria crea un ambiente más favorable para el crecimiento de *H. pylori* y facilita la colonización del estómago por otras bacterias con acumulación de compuestos carcinogénicos (productos del metabolismo de dichos microorganismos, o de los mecanismos de defensa del hospedero). Con lo anterior aumenta la probabilidad de alteraciones a nivel celular y genómico, que conducen a metaplasia intestinal, displasia y finalmente carcinoma gástrico (Stemmermann y Fenoglio-Preiser, 2002; Rubiano y Velásquez, 2007; Suzuki et al, 2007). El modelo de Correa (Figura 1) considera que el proceso podría iniciar en la infancia con la inflamación de la mucosa gástrica perpetuándose hasta la adultez, donde aparecen las lesiones precursoras que pueden llegar en algunos casos hasta la neoplasia. Estos cambios precursores en su mayoría son asintomáticos y dificultan la detección temprana (Goodman y Correa, 1995; Goodman et al, 1997).

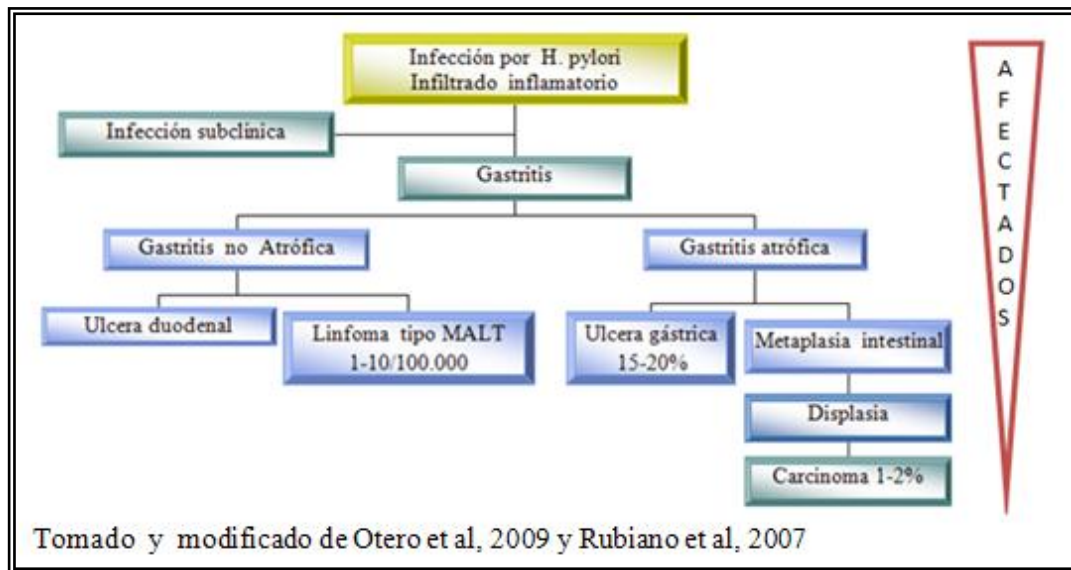


Figura 1. Carcinogénesis gástrica. Historia natural de la infección.

En la figura 1 se ilustra el modelo de carcinogénesis gástrica, se asume la presencia de otros factores ambientales como exceso de consumo de sal y alimentos con nitritos entre otros. Se observa que si bien la infección de la bacteria afecta a una población grande el cáncer gástrico solo se observa en una pequeña proporción (1-2%). La infección por sí sola no es suficiente para el desarrollo de gastritis, ya que factores como virulencia de la bacteria (baja virulencia) y respuesta inmune del hospedero (mediada por LT CD4+ TH2) podrían explicar la aparición de infecciones asintomáticas (infección subclínica). La gastritis no atrófica se observa igualmente en países desarrollados o en poblaciones de bajo riesgo de cáncer gástrico, estando o no asociada a úlcera duodenal. La infección persistente y su actividad citotóxica alterarían la barrera protectora de la mucosa gástrica frente a compuestos como el N-nitroso, la sal y otros irritantes, lo cual favorecería el desarrollo de gastritis crónica atrófica que, al alcalinizar el pH, favorece la proliferación bacteriana. Esto favorece la transformación de las aminas secundarias en nitrosaminas que, al ser absorbidas por la mucosa, permiten el cambio por metaplasia intestinal en el epitelio, proceso que puede transformarse en displasia y posteriormente en carcinoma (CorreayHoughton, 2007; Correa y Piazuelo, 2008).

A pesar de los adelantos médicos de las últimas décadas, el cáncer gástrico continúa siendo letal, con una tasa de supervivencia a 5 años muy baja, cuando se detecta en estados avanzados. La prevención y el diagnóstico temprano son las estrategias más promisorias para el control de la enfermedad. La erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica, permite la regresión de las lesiones precursoras y la reducción en el riesgo de desarrollo de la patología (Parkin, 2004; Bayerdorffe et al, 1995; Sugiyama, 2002; Mera et al, 2006; Wong et al, 2012).

2.2.1 Papel de la respuesta inmune en la infección por *H. pylori*

La infección estimula tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Giraldin et al, 2003). El paso inicial en este proceso es el reconocimiento del microorganismo a través de Nod1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain protein 1*), que identifica un muropéptido de los peptidoglicanos de estas bacterias (Giraldin et al, 2003). Después del reconocimiento por Nod1, numerosas células inflamatorias infiltran el epitelio colonizado, agudizan la inflamación y participan en la generación de una respuesta inmune adaptativa (Giraldin et al, 2003). Así, la respuesta innata es un factor determinante fundamental en la gravedad de la enfermedad y la carcinogénesis gástrica.

La respuesta inmune adaptativa a *H. pylori* es predominantemente mediada por células LT-CD4+ Th1, asociada a la liberación de citoquinas proinflamatorias IL1, IL2, IFN γ y la activación de macrófagos. Este tipo de respuesta de linfocitos LT-CD4+Th1, se asocia con gastritis y atrofia gástrica, en contraste con la respuesta mediada por citoquinas anti-inflamatorias IL4, IL10, característica de la respuesta de linfocitos LT-CD4+Th2, que parece ser protectora. La respuesta de linfocitos LT-CD4+Th1, es una respuesta “equivocada”, ya que *H. pylori* es una bacteria extracelular que, al igual que microorganismos similares, debería desencadenar una respuesta LT-CD4+Th2 (Ma et al, 2003). La respuesta LT-CD4+Th1 produce interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-12, IL-18 (Girardin et al, 2003). Estas citocinas tipo I activan los macrófagos, los cuales, a su vez, secretan factores pro-inflamatorios y adquieren mayor capacidad bactericida en comparación con su activación por respuesta celular LT-CD4+Th2 (Girardin et al 2003). La gravedad de la gastritis crónica se correlaciona con el número de células que secretan IFN γ (Malaty et al, 2007; Mueller et al, 2005). La diferenciación de la respuesta inmune del tipo LT-CD4+Th1 parece que es influida por la bacteria misma y por factores ambientales (Correa y Schneider, 2005; Mueller et al, 2005). Las infecciones por parásitos que inducen respuesta LT-CD4+Th2 se ha sugerido como un factor que explica la menor incidencia de cáncer gástrico en regiones de África “enigma africano” (Holcombe et al, 1990), e incluso en Colombia, se ha documentado en niños de Tumaco, una región de menor prevalencia de cáncer gástrico, comparada con Pasto (Ghary et al, 2005). La

respuesta LT-CD4+Th2 produce IL-4, IL-5, IL-10 y factor de crecimiento transformante β de fibroblastos, IgA de mucosas e IgE, y disminuye la inflamación causada por LT-CD4+Th1 en respuesta al *H. pylori* (Whary et al, 2005), que afecta la progresión de gastritis crónica a atrofia, displasia y cáncer. De esta manera, la helmintiasis en los niños promueve la polarización a LT-CD4+Th2, la cual altera la respuesta usual a la infección por *H. pylori*, que puede disminuir el riesgo de cáncer gástrico más tarde en la vida de esos individuos. La infección tiene un largo período subclínico, durante el cual produce inflamación y daño progresivo de la mucosa gástrica. No obstante que las diferentes cepas de *H. pylori* difieren en su capacidad para producir inflamación (Ernst et al, 2006), el desenlace clínico depende de la interacción entre las características genéticas del huésped, el medio ambiente y el microorganismo (Wu et al, 2005).

2.3 TRATAMIENTO.

El tratamiento recomendado por el Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia para la erradicación de *H. pylori*, tiene una duración de 15 días y está constituido por claritromicina 500 mg dos veces por día, amoxicilina 1000mg dos veces por día o metrodinazol 500 mg dos veces por día, y esomeprazol 40 mg por día o omeprazol 40 mg por día;este esquema tiene una eficacia de 85% al 90% (Minsalud, 2013). Con el tiempo la eficacia del 90% del esquema (Graham y Shiotani, 2008), se ha visto reducido a 57% y 73% cuando la duración del tratamiento es de siete días y de 67-79% cuando es de diez días (Vakil y Megraud, 2007). Estos resultados se alejan del propósito de erradicación del *H.pylori*, donde se pretende erradicar de al menos en el 90% de los pacientes tratados. Esta reducción podría ser atribuida al uso de dosis inadecuadas, a insuficiente tiempo de uso o abandono la medicación, a la disminución de su actividad por interacciones con otras sustancias y la resistencia de la bacteria (Yepes et al, 2008).

2.3.1 Antimicrobianos utilizados para erradicar *H. pylori*.

Si bien la resistencia a los antimicrobianos es una de las principales causas de fracaso del tratamiento en *H. pylori* y es en gran parte responsable de la disminución de las tasas de erradicación. Para algunos antibióticos la resistencia es intrínseca, es decir, que todos los

organismos de *H. pylori* son resistentes y en consecuencia estos antibióticos no puede usarse para el tratamiento. Estos antibióticos son glucopéptidos, polimixinas, ácido nalidíxico, sulfonamidas, trimetoprima y agentes antimicóticos (Urrestarazu et al, 2003; Mégraud et al, 2009). En otros casos, la resistencia puede ser adquirida por mutaciones puntuales en los genes diana para el antibiótico, como es el caso para la amoxicilina y la claritromicina donde la resistencia se asocia a la presencia de mutaciones puntuales en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* respectivamente (Mégraud y Corti, 2009).

Los antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que se utilizan o se pueden utilizar en los tratamientos para erradicar la infección son los siguientes:

La amoxicilina: este antibiótico es una penicilina semisintética, de actividad bactericida, estable a pH ácido, con biodisponibilidad por vía oral, y que incrementa su actividad antimicrobiana con la neutralización del pH del estómago. Este antibiótico pertenece a la familia de los β -lactámicos, que desempeñan su función mediante la inhibición de la síntesis de la capa de peptidoglucano de la pared celular bacteriana uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (*protein binding of penicillino* PBP) debilitando la pared celular y produciendo lisis celular (Sauvage et al, 2008; Fernández et al, 2009). Estas PBPs son enzimas que llevan a cabo carboxipeptidación y transpeptidación, pasos finales de la biosíntesis del peptidoglicano (Jones et al, 2008), además producen cambios en la permeabilidad a la droga y alteraciones en las bombas de eflujo multidrogas como también en las porinas. En *H. pylori* se han descrito tres PBPs (PBP1, PBP2 y PBP3) que corresponden a los marcos de lectura abierto (ORF) HP0597 (homóloga a la PBP1a de *Escherichia coli*), HP1556 (homóloga a la proteína FtsI) y HP1565 (homóloga a PBP2 de *H. pylori*) respectivamente, de acuerdo a la notación de la secuencia del genoma de *H.pylori* 26695 (Gerrits et al, 2004).

Las mutaciones en la secuencia de ADN del gen *pbp1* generan cambios de aminoácidos en la proteína PBP1, estos disminuyen la afinidad por la amoxicilina produciendo un fenotipo resistente (Okamoto et al, 2002). Entre las sustituciones asociadas a la resistencia se

encuentran Ser414Arg (Know et al, 2003), Glu406Ala, Ser417Thr, Met515Ile, Asp535Asn, Ser543Arg, Thr556Ser, Asn562Tyr, Lys648Gln, Arg649Lys, Arg656Pro (Owen et al, 2003; Know et al, 2003; Matteo et al, 2008), Ala369Thr, Val374Leu, Leu423Phe, Thr593Ala y Gly595Ser (Rimbara et al, 2008). Además, un estudio *in-vitro* encontró que la mutación Thr438Met es suficiente para producir resistencia y este fenotipo es transmitido a otras cepas mediante transformación genética (Co y Schiller, 2006).

La claritromicina: es un antibiótico semisintético (macrolido) de actividad bacteriostática, que no es estable a pH ácido; penetra la membrana externa y pared celular de los microorganismos susceptibles y se une en forma irreversible a la subunidad 50S del ribosoma, inhibiendo la translocación del aminoacilRNA y la síntesis de proteínas (Blondeau et al, 2002), lo cual es el resultado de la interacción del macrólido con el dominio II del 23S *rRNA* y la horquilla peptidiltransferasa (Hansen et al, 1999), en el túnel ribosomal (Yonath et al, 2005), donde se unen cuando este se encuentra vacío o en traducción de péptidos cortos (Tenson et al, 2003) bloqueando la progresión de la proteína nascente, lo que ocasiona la interrupción en la elongación (Garza-Ramos et al, 2001, Yonath et al, 2005). La resistencia a este antibiótico en *H. pylori* se ha asociado a mutaciones puntuales en el dominio V del gen 23S *rRNA*, entre estas se encuentran: A2115G, G2141A, A2142G, A2142C, A2142T, A2143G, A2143C, A2143T y T2717C (Fontana et al, 2003; Van Doorn et al , 2000). Debido a que la resistencia a macrólidos está codificada en el cromosoma y se transfiere en forma vertical a su descendencia, su dispersión se encuentra relativamente limitada (Calvo y Martínez, 2009).

El metronidazol: es un antibiótico nitroimidazólico, lo que implica que es activo después de la reducción del grupo nitro unido al anillo imidazólico. Este proceso genera compuestos intermediarios de vida corta y altamente tóxicos. El metronidazol tras ingresar en la célula mediante difusión pasiva, donde es reducido y produce pérdida de la estructura helicoidal del DNA, rotura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular.

El mecanismo de resistencia a metronidazol implica la inactivación del gen *rdx*, que codifica para una nitrorreductasa insensible al oxígeno; la cual se puede producir por una mutación puntual que crea un codón de terminación adicional, dando lugar a una proteína truncada o por la inserción de una secuencia IS605. Otros genes, como *frxA*, *fdxB*, *ribF* o *mdaB*, pueden tener también implicación en la resistencia. El porcentaje de resistencia es muy variable; en los países subdesarrollados es mayor, debido principalmente al alto consumo de este antibiótico para tratar enfermedades parasitarias e infecciones ginecológicas. (Wu et al, 2012)

La tetraciclina: este antibiótico de actividad bacteriostática no puede utilizarse en enfermos pediátricos. La tetraciclina ingresa a la bacteria a través de porinas mediante difusión pasiva, llega al citoplasma por un mecanismo dependiente de energía y en el interior se une reversiblemente a la subunidad 30S produciendo una inhibición de la síntesis de proteínas. El mecanismo de resistencia descrito para *H. pylori* consiste en mutaciones puntuales en el gen *16S RNA* en la posición 926-928 (cambio de AGA por TTC). Cuando se lleva a cabo una única sustitución se produciría resistencia de bajo nivel; sin embargo, si se presentan 3 mutaciones la resistencia sería de alto nivel. También se ha propuesto como mecanismo de resistencia la reducción de la permeabilidad, ya que algunas cepas resistentes no presentan las mutaciones descritas y muestran una disminución de la acumulación de la tetraciclina. (Wu et al, 2012)

La furazolidona: El mecanismo de acción es similar al del metronidazol: reducción de la prodroga llevando a la formación de radicales nitro aniónicos y se produce daño del DNA. El mecanismo de resistencia no se conoce, pero es diferente del de metronidazol porque la resistencia no es cruzada. (Wu et al, 2012)

El levofloxacin: este antibiótico es una quinolona, de actividad bactericida. Las quinolonas inhiben la replicación del DNA, actúan en el DNA cromosómico bacteriano, uniéndose a las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las quinolonas actúan sobre dos proteínas diana: DNA girasa y topoisomerasa IV (ambas son topoisomerasas responsables

de los cambios en la topología del DNA). En el caso de bacterias gramnegativas, como es el caso de *H. pylori*, actúan inhibiendo la DNA girasa, la cual es un tetrámero con dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. En cuanto a los mecanismos de resistencia descritos principalmente son alteraciones en alguna de las subunidades de la DNA-girasa, mutaciones en el *gyrA*: el gen que codifica la subunidad A. Las mutaciones suelen producirse en una región concreta de esos genes que se denomina **QRDR** (*quinolone resistance domain region*). Cambios en los aminoácidos de esta región alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas en el complejo girasa-DNA, y la resistencia se debe a una disminución de la afinidad de la quinolona por dicho complejo. En *H. pylori* se han descrito cuatro tipos de mutaciones en el gen *gyrA*, el cambio de Asn por Lys en el aminoácido 87, el cambio de Ala por Val en el aminoácido 88, el cambio de Asp por Gly, Tyr o Asn en el aminoácido 91 y mutaciones simultáneamente en 91(Asp-Asn) y en 88 (Ala-Val) (Wu et al, 2012).

La rifabutina: es un antibiótico derivado semi-sintético de la rifampicina, utilizado normalmente para el tratamiento de infecciones producidas por micobacterias y en infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* o *Legionella* spp. Entre otras, ha demostrado tener una alta eficacia contra *H. pylori*.

El mecanismo de acción consiste en la inhibición del inicio de la síntesis de RNA, al inhibir la enzima RNA polimerasa. La resistencia a la rifampicina tiene lugar por mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa, que reducen la afinidad de esta subunidad por el antibiótico. Las mutaciones descritas corresponden a los aminoácidos en las posiciones 149, 524-545 y 586. (Wu et al, 2012)

En la terapia de erradicación (triple terapia) se emplea simultáneamente a la amoxicilina, la claritromicina, un antibiótico semisintético de actividad bacteriostática, que no es estable a pH ácido, por lo que se administra junto con antisecretores como los IBP (inhibidores de la bomba de protones), compuestos de bismuto y los antagonistas de los receptores tipo 2 de

la histamina (Endo et al, 2001; Erah et al, 1997). Estos antisecretorios se describen a continuación:

Compuestos de bismuto: citrato de bismuto coloidal y salicilato de bismuto. Actúan como citoprotectores. Aumentan la producción de moco y prostaglandinas por la mucosa gástrica. Además, evitan la unión de *H. pylori* a la superficie de la mucosa gástrica y destruyen la integridad de la pared bacteriana.

Fármacos antagonistas de los receptores de histamina: cimetidina, famotidina, nizatidina, roxatidina, ebrotidina, ranitidina y ranitidina citrato de bismuto. Actúan en la membrana basolateral de la célula parietal gástrica como antagonistas competitivos de la histidina sobre los receptores de histamina. Reducen por tanto la secreción ácida tanto basal como la estimulada por gastrina, histidina y antagonistas muscarínicos.

Inhibidores de la bomba de protones: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol y rabeprazol. Actúan en la célula parietal (membrane subapical). Inhiben de forma reversible la enzima H-K ATPasa, bloqueando toda secreción de ácido

2.3.2 Métodos de evaluación de susceptibilidad *in-vitro* a antibióticos:

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la susceptibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. Esta se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano visible (EUCAST 2000). Entre los métodos más ampliamente utilizados para evaluar la susceptibilidad *in-vitro* a antibióticos en bacterias se encuentran:

Difusión en disco: El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar

a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.

Método E-test (AB Biodisk, Suecia): este método evalúa la resistencia antimicrobiana, en el cual una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano, este se deposita en la superficie del agar, después de inoculado el organismo. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

Dilución en agar: este método evalúa el crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo, usualmente en incrementos geométricos en base 2 del antibiótico. Posteriormente se inoculan las bacterias al medio y se incuban, determinando que concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Simultáneamente se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente para determinarse también la actividad bactericida. El método de dilución en agar es considerado el método de referencia para evaluar la actividad de antibióticos en *H pylori*, para lo cual se debe considerar un inóculo bacteriano entre 10^4 a 10^8 UFC, lecturas después de 3 días de incubación (Alarcon et al, 1999).

2.4 SECUENCIACION DE ADN POR EL MÉTODO *Big Dye Terminator*.

El método de secuenciación *Big Dye Terminator* de ABI, se fundamenta en la automatización del método del dideoxi o Sanger y que empleado en Analizador Genético Applied Biosystems 3500 posee una capacidad de lectura de secuencia de aproximadamente 1,000 pares de bases. Esta metodología de secuenciación, se basa en el

uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. Las enzimas del tipo de la ADN polimerasa requieren de un templado de ADN de cadena sencilla, y realizan la síntesis de la hebra complementaria extendiéndola a partir de un iniciador en dirección 5' a 3'. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos (A, T, G y C) que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los ddNTPs es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico, cada uno de los ddNTPs se marca con fluorocromo distinto, luego se pasa por un capilar donde incide un haz de luz, excitando el fluorocromo y se registra la señal, que es representativa para cada base, ya que la migración en el capilar se realiza por tamaño del fragmento, permite sobreponer las señales de los diferentes fragmentos y construir por superposición la secuencia (Necochea & Canul 2004)

2.5 JUSTIFICACIÓN

En países en vía de desarrollo como Colombia, las enfermedades gástricas como la gastritis, la úlcera péptica y el cáncer gástrico constituyen un problema de salud pública. Los conocimientos recientes indican que la gran mayoría de estas afecciones son causadas por la infección por *H. pylori*. Los estudios realizados en nuestro país, señalan la presencia de regiones de alto y bajo riesgo para el cáncer gástrico, aún cuando la prevalencia de la infección es similar (>80%). Si bien la diferencia en el riesgo se ha asociado a la virulencia de la cepa infectante, se considera necesaria la persistencia de la infección y su interrelación con agentes ambientales como estímulos previos para el desarrollo de lesiones precancerosas y finalmente el carcinoma, que puede ser evitado mediante la erradicación del agente infeccioso; por lo cual, la información sobre la sensibilidad o resistencia del microorganismo a los agentes de erradicación empleados con mayor frecuencia, es altamente requerida, al igual que los mecanismos moleculares que se encuentran involucrados.

Entre los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a amoxicilina y claritromicina se encuentran las mutaciones en los genes *pbp1A* y *23S rRNA*, características que no se han estudiado en aislados de *H. pylori* de pacientes provenientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, que presentan contraste en el riesgo a cáncer gástrico, lo cual permitirá conocer la asociación de la mutaciones en la resistencia en poblaciones de contraste, ya que se han descrito efectos contrastantes de la mutaciones entre regiones y localidades (Jafri et al, 2008). Esta información permitirá la implementación de metodologías para la detección rápida de las mutaciones puntuales en estos genes como RT-PCR (Tankovic et al, 2007; Kargar et al, 2012), DNA chip(Xuan et al, 2009), con el fin de predecir la resistencia antibiótica, información que permitirá establecer tratamientos alternos efectivos contra la infección (esto se recomienda para la terapia triple cuando la resistencia es de 15-20% para la claritromicina y de 0% a 29% en el caso de la amoxicilina según Agañoto et al, 2002).

2.6 HIPOTESIS

La incidencia del cáncer gástrico varía en las diferentes regiones del mundo; encontrándose en las regiones de alto riesgo a cáncer gástrico incidencias en un rango entre 12 a 40 casos por cada 100.000 habitantes, como es el caso de la región de Asia, donde se destacan países como Japón, China y Corea, y donde se han observado prevalencias en la resistencia a la claritromicina entre 4.4 % a 89.9% (Chen et al, 2004; Zhenget al, 2001; Yang et al, 2001; Zheng et al, 2001; Perez et al, 2002; Hao et al 2004; Kato et al, 2002; Eun et al, 2003; Chen et al, 2004; Liu et al 2011) y de 0 a 21.3 % a amoxicilina (Perez et al, 2002; Hansomburana et al, 2012). En estos países se observa la prevalencia de mutaciones A21243G, A2142G, y A2144G en gen 23S rRNA en el 10–93 % los aislados resistentes a claritromicina (Kato et al, 2002; Matsamura et al, 2001; Woo et al, 2009) y las mutaciones A369T (Rimbara et al, 2008) M515I, E506A, S517T, D535N, S543R, T556S, N562Y (Kwon et al, 2003; Rimbara et al, 2007; Matteo et al, 2008), L648G, A649L, A656P (Tseng et al, 2009), T593A (Okamoto et al, 2002) en el *pbp1A* asociadas a la resistencia a amoxicilina presentes hasta el 3% de los aislados de *H. pylori* evaluados en estos estudios. Al comparar estos valores con lo encontrado en países con incidencias de cáncer gástrico bajo como: Estados Unidos, Francia y Alemania; los cuales registran incidencias de esta patología de entre 4.1 a 5 casos por cada 100.000 habitantes y donde la prevalencia de la resistencia a claritromicina varía entre 0.9% a 18 % y la resistencia a amoxicilina es de aproximadamente 0% a 0.9 (Duck et al, 2004; Tankovic et al 2001; Tankovic et al, 2007; Las cols et al, 2003; Wueppenhorst et al, 2009) y donde la incidencia de las mutaciones A2142G, A2142C y A2143G en gen 23S rRNA, asociadas a resistencia a claritromicina en *H. pylori*, se encuentra entre 1.8% a 4 % de los aislados evaluados en diferentes estudios (Wolle et al, 2002; Van Doorn et al, 2001; Moder et al, 2007, Raymond et al, 2007) y las cuales la prevalencia de las mutaciones: S414A (Gerrits et al, 2002), S402G, E406A, Q406A, S417T, (Gerrits et al, 2006), Y484C, T541I, P600T (Paul et al, 2001), T438M (Co y Schiller, 2006) en el gen *pbp1A* en aproximadamente 2% de los aislados analizados en estos estudios. Se observa diferencia en la prevalencias de la resistencia a la claritromicina y amoxicilina, y las diferencias en la frecuencias de las mutaciones y en la presencia de estas entre regiones de contraste a riesgo de cáncer gástrico. Adicionalmente teniendo como base que la persistencia de la infección

es una característica necesaria para la persistencia del daño en el tejido gástrico y desarrollo de la patología (cáncer gástrico); y que la persistencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica está garantizada por los mecanismos que la bacteria posea, como la resistencia a los antibióticos empleados en su erradicación, y que esta resistencia, en el caso de amoxicilina y claritromicina se ha asociado a mutaciones puntuales en los genes *23S rRNA* y *pbp1A*, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

El contraste en el riesgo a cáncer gástrico entre las poblaciones de Tumaco (bajo riesgo) y Túquerres (alto riesgo), está asociado a las mutaciones en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* de *H. pylori* que le confieren resistencia a la claritromicina y amoxicilina, esperándose mayor frecuencia de estas mutaciones en aislados de *H.pylori* procedentes de Túquerres.

2.7 OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible asociación entre mutaciones puntuales en los genes *23S rRNA* (*domino V*) y *pbp1A* (*dominios transglicosilasa y transpeptidasa*), y la resistencia a claritromicina y amoxicilina en aislados de *Helicobacter pylori* de pacientes con gastritis crónica provenientes de dos poblaciones con contraste en el riesgo de cáncer gástrico, Tumaco (bajo riesgo) y Túquerres (alto riesgo), donde no se han descrito.

3. METODOLOGÍA GENERAL.

En esta sección del documento se describe la población apartir de la cual se toman las muestras para la presente investigación.

3.1 Descripción y antecedentes de las poblaciones evaluadas.

El presente proyecto se realizó empleando muestras provenientes de dos proyectos de investigación previos. El primero titulado "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica" financiado por Colciencias (código No 1106-408-20549 RC 3012007) y avalado por elCIREH (Comité Institucional de Revisión de Ética Humana-Universidad del Valle), según acta No 073-07 (Pazos et al 2011). En esta investigación se tomaron 10 biopsias gástricas (tabla 1), de 203 pacientes de Tumaco (predominantemente afrodescendientes) y 206 pacientes de Túquerres (predominantemente mestizos) con gastritis crónica. Las biopsias se emplearon en la detección de la infección de *H. pylori* mediante histología (Dixon) y cultivo (agar Columbia). Adicionalmente los pacientes infectados se trataron por 14 días con el esquema triple amoxicilina (Genfar®) 1000mg 2 v/d, claritromicina (Genfar®) 500mg 2 v/d y Omeprazol (Genfar®) 20mg; y el éxito de la erradicación de la infección se evaluó a los 45 días de haber suministrado el tratamiento triple, mediante la prueba en el aliento [13C]-Urea (espectroscopia infrarroja).

Tabla 1. Protocolo de toma de biopsias por endoscopia.

Espécimen	Medio de almacenamiento	Procedimiento
Dos muestras de mucosas gástrica antral, curvatura mayor y menor	Tioglicolato conglicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores devirulencia
Cuatro muestras: dos de antro y dos de cuerpo gástrico	Formolal 10%	Análisis histopatológico
Dos muestras de mucosas gástrica de cuerpo, curvatura mayor y menor	Tioglicolato conglicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores devirulencia
Una muestra de mucosa gástrica de cuerpo pared anterior media y otra de antro curvatura menor	Tioglicolato conglicerol	Preservación a -70°C

En este estudio, se obtuvieron 321 aislamientos de *H. pylori* de los cuales 172 provinieron de pacientes de Tumaco y 149 de Túquerres. Los participantes presentaron un rango etario entre 18 -68 años, con una participación mayoritaria de mujeres con un 62.6% (201/321).

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes de Tumaco y Túquerres

Edad (años)	Tumaco		Túquerres	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
18-34	15 (8.7)	42 (24.4)	25 (16.8)	29 (19.5)
36-47	13 (7.6)	39 (22.7)	21 (14.1)	32 (21.5)
48-68	23 (13.4)	40 (23.3)	23 (15.5)	19 (12.8)
Total	51 (29.7)	121 (70.4)	69 (46.3)	80 (53.7)

En la tabla 2, se observan las características etarias de los participantes del estudio, los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la característica (Pazos et al, 2011).

Posteriormente en el marco del proyecto titulado “Mutaciones puntuales en los genes 23S del *rRNA* y *pbp-1A* de *Helicobacter pylori*: resistencia a claritromicina y amoxicilina *in vitro* y su relación con fracaso terapéutico” financiado por la Universidad del Valle y Colciencias (código No 1106-493-26237RC5102009) y avalado por el CIREH (Comité Institucional de Revisión de Ética Humana-Universidad del Valle), según acta No 176-08 (Figuerola et al, 2012).

Este estudio empleó, en su fase inicial 172 aislados de *H. pylori* obtenidos del proyecto anterior, obtenidas a partir de biopsias gástricas de pacientes procedentes de Tumaco; a los cuales evaluó mediante el método de dilución en agar, la resistencia *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina (considerando un aislado resistente al observar crecimiento a $\geq 1\mu\text{g/mL}$ de ambos antibióticos). En este estudio se evaluó la resistencia *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina en el 84.8% (146/172) de los aislados de *H. pylori* procedentes de pacientes de Tumaco; de estos el 19.8% (29/146) y el 20.5% (30) fueron resistentes en condiciones *in-vitro* a claritromicina y amoxicilina respectivamente (tabla 3).

Tabla 3. Resistencia *in-vitro* de los aislados de *H. Pylori* de la población de Tumaco-Nariño.

	Claritromicina	Amoxicilina
Susceptible	117 (80.2)	116 (79.5)
Resistente	29 (19.8)	30 (20.5)
Total	146 (100)	146 (100)

En la tabla 3, se observan la resistencia a los antibióticos claritromicina y amoxicilina en aislados de *H. pylori* de Tumaco-Nariño. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la característica.

En esta población, los aislados de *H. pylori* resistentes a amoxicilina y claritromicina se observaron en el 66.6% (20/30) y 72.4% (21/29) de mujeres de Tumaco. El 40% (12/30), 26.6% (8/30) y 33.4 % (10/30) de los aislados de *H. pylori* resistentes a amoxicilina se presentaron en los rangos etarios de 19-35, 36-47 y 48-68 respectivamente. Los aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina se observaron en el 31% (9/29), 34. 5% (10/20) y 34.5% (10/20) de los pacientes entre 19-35, 36-47 y 48-68 respectivamente (Figuroa et al 2012).

Tabla 4. Características demográficas de los pacientes de Tumaco, con aislados de *H.pylori* resistentes *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina.

Características Demográficas	Amoxicilina	Claritromicina
Edad (años)		
19-35	12(40.0)	9(31.0)
36-47	8(26.6)	10(34.5)
48-68	10(34.4)	10(34.5)
Sexo		
Masculino	10(33.4)	10(26.6)
Femenino	20(66.6)	21(72.4)

En la tabla 4, se observa la distribución de los aislados de *H. pylori* resistentes a amoxicilina y claritromicina, según la edad y sexo de los pacientes (Figuroa et al, 2012). Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la característica.

3.1.1 Población empleada para el estudio.

En la presente investigación se emplearon los dos estudios descritos previamente como fuentes de muestras. La primera fuente correspondió a 147/149 (2 preservados inviables) aislados de *H. pylori* de Túquerres; a estos se les evaluó la resistencia *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina mediante el método de dilución en agar.

La segunda fuente fueron 59 aislados de *H. pylori* de línea de base que fueron resistentes *in-vitro* (29 para claritromicina y 30 para amoxicilina) de la población de Tumaco descrita previamente. Los aislados de línea de base correspondieron a los aislados obtenidos a partir del cultivo de las biopsias gástricas y que nunca estuvieron expuestos *in-vitro* a ninguno de los antibióticos y a partir de los cuales se realizó la prueba de dilución en agar para evaluar la susceptibilidad *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina.

Adicionalmente se emplearon 30 aislados de *H. pylori* sensibles de línea de base para claritromicina y 11 para amoxicilina como controles negativos de las mutaciones, estos fueron seleccionados aleatoriamente en el total de los preservados de la población. Este mismo criterio se empleó para seleccionar los controles negativos de la población de Túquerres.

3.2 Cultivo y aislamiento de *H. pylori*

En esta sección del documento se describe la metodología del cultivo a partir de las biopsias gástricas, que se realizó en la investigación inicial, y adicionalmente los cultivos a partir de estos preservados iniciales, requeridos para los análisis en la población de Túquerres.

3.2.1 Cultivo inicial a partir de biopsia gástrica.

El cultivo inicial a partir de cual se aisló *H. pylori* de biopsias gástricas, se realizó mediante la introducción de la biopsia en 200 µL de NaCl 0.89% estéril, y macerando con microbolillo estéril, del macerado resultante se tomó con asa de argolla desechable

(Fisherbrand ® calibrada a 10µL /gota), y se sembró por estría, en agar Columbia (Oxoid ®) con sangre desfibrinada de cordero mas 10% suplemento Dent (Oxoid ®) el cual contiene Vancomicina, Cefsulodin, Lactato de Trimetoprim y Anfotericina B. Luego de la siembra se preservó el macerado de mucosa gástrica en una solución de tioglicolato (Merk®) con glicerol (Promega ®) 20% y se almaceno a -70°C.

La incubación de las cajas de petri se hizo en una incubadora de CO₂ (Shel Lab®) a 37°C con atmosfera de CO₂ al 10% y 90% de humedad. El crecimiento se evaluó a las 72 horas y luego periódicamente de 7 a 10 días, en busca de colonias traslúcidas, pequeñas y en forma de gotas de rocío, compatibles con la morfología de *H. pylori*. Se evaluó la calidad del crecimiento y la contaminación por hongos o bacterias tanto en el aislamiento primario como en el antibiograma.

3.2.2 Siembra del preservado

Para evaluar la susceptibilidad a amoxicilina y claritromicina en los 147 preservados viables de *H. pylori* de la población de Túquerres, se necesitó aislar nuevamente la bacteria, a partir de sus preservados. Para este fin, se tomó una fracción del preservado (-70°C), con lanceta estéril, esta se depositó en agar columbia (Oxoid®) con sangre desfibrinada de cordero al 10%, sin suplemento. Se sembró en masa e incubó a 37°C en ambiente microaerófilico (CO₂ al 10 % y 90 % de humedad). El crecimiento se evaluó a las 72 horas y luego periódicamente de 7 a 10 días. El contenido restante del preservado se almacenó a -70°C.

3.2.3 Purificación de los aislados de *H. pylori*.

Las colonias obtenidas previamente y que presentaron fenotipo compatible con *H. pylori*, se y sembraron por triplicado empleando el método estría con asa estéril (10 µL), en agar columbia (Oxoid®) más sangre desfibrinada de cordero al 10%, con suplemento Dent (Oxoid®), el cual contenía Vancomicina, Cefsoludina, Lactato de Trimetoprima y Anfotericina B. Las cajas se incubaron (incubadora Shel Lab®), a 37°C en ambiente microaerófilico (CO₂ al 10% y 90% de humedad). El crecimiento se evaluó inicialmente a las 48 a 72 h, seguidos de evaluaciones periódicas cada 24 h en un periodo de tiempo de 7 a

10 días; a las colonias resultantes se les realizó las pruebas de identificación fenotípica y amplificación del gen *ureA*.

3.2.4 Identificación fenotípica de *H. pylori*.

Macroscópicamente se buscaron colonias pequeñas, puntiformes y traslúcidas, con bordes definidos, a las que se les realizaron las siguientes pruebas de identificación: la prueba de oxidasa, de catalasa, Test de urea (*Host Test*) y tinción de Gram (Anexo A). Finalmente para su correcta identificación se compararon con los resultados expuestos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* para la identificación de *H. pylori*. Adicionalmente la identificación molecular se realizó mediante amplificación por PCR del gen estructural *ureA* de *H. pylori*.

3.2.5 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de aislados de *H. pylori* de 59 aislados resistentes de Tumaco (29 para claritromicina y 30 para amoxicilina) y 41 aislados susceptibles (30 para claritromicina y 11 para amoxicilina) en *línea de base*. Este método de extracción se empleó en las muestras de la población de Túquerres.

Para la extracción de ADN bacteriano se tomó 1 mL de preservado (80% Tioglicolato y 20% glicerol) de *H. pylori* a -70°C y depositó en tubo eppendorf de 1.5 mL, que seguidamente se centrifugó (centrifuga refrigerada Forma Scientific®) a 13.000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y se adicionó 300 µL de buffer de lisis (Proteinasa K 100µg/ml, SDS 10%, EDTA 0.5M y Tris-HCl pH 8) y se incubó a 56 °C por 18 h, seguido de 10 min a 72 °C. Terminada la incubación se adicionó 120 µL de NaCl 5M y centrifugó a 13.000 rpm por 5 min, seguidamente se transvasó el sobrenadante y descartó el precipitado. Se adicionó 840 µL de Etanol absoluto (Mallinckrodt®) y centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C por 20 min, se descartó el sobrenadante y adicionó 300 µl de etanol al 70%, centrifugando a 13000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante; se dejó secar por espacio de 2 h; se resuspendió en 100 µl de Buffer TE y almacenó a -20 °C. La cantidad y la pureza del ADN bacteriano se determinó por lectura de densidad óptica a 260/280 nm en espectrofotómetro

(Gene Quant II® Pharmacia Biotech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.2.6 Amplificación del gen ureA.

La identificación molecular de *H. pylori* se realizó mediante la amplificación por PCR del gen ureA. La reacción se realizó en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco), adicionando los siguientes reactivos a un tubo de 0.2 mL: 1X de buffer de PCR (Buffer green 5X Promega®), 1 µM de MgCl₂ (Promega®), 0.25 mM de dNTPs (Promega®), 50 pmol/µL de cada cebador (sentido 3'-AAGACATCACTATCAACG-5'/ anti-sentido 5'-CCCGCTCGCAATGTCTAA-3'), 0.5 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega®); y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó por una desnaturalización inicial a 95 °C/2 min, seguida de 35 ciclos [95 °C/1 min, 54 °C/1 min y 72 °C/1 min] y una extensión final a 72 °C/ 15 min. Los productos de amplificación fueron obtenidos por electroforesis de a 80 voltios por 1 h en una cámara horizontal (spectroline bio-o-visión®). Estos se visualizaron mediante fluorescencia en luz U.V. (260/280 nm) en un transiluminador (spectroline bio-o-visión®) en geles de agarosa (sigma®) al 2 % teñida con 1 µL de bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Para determinar el tamaño de los amplificados de todos los genes se empleó un marcador de peso de 100 pb (Fermentas ®); el tamaño amplicon correspondió aproximadamente a 167 pb (fragmento esperado mediante el análisis in silico y respecto a la distancia de migración del marcador de pares de bases).

3.2.6 Evaluación de la susceptibilidad de los aislados de *H. pylori* a claritromicina mediante el método de dilución en agar.

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó empleando la metodología de dilución en agar aplicada a los aislados de *H. pylori* provenientes de pacientes de Tumaco en el estudio: Mutaciones puntuales en los genes *23S del rRNA* y *pbp-1A* de *Helicobacter pylori*: resistencia a claritromicina y amoxicilina *in vitro* y su relación con fracaso terapéutico y donde el punto de corte para considerar una cepa resistente a claritromicina definió como un CIM mayor o igual a 1.0 µg/mL (Figuerola et al, 2012).

Esta se realizó a los 147 aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres, obtenidos a partir del cultivo en agar Columbia base. Para esto se sembró por triplicado y por agotamiento un inoculo de aproximadamente 6×10^8 UFC/mL (McFarland 2), en agar Mueller Hinton (Merck®) suplementado con 10% de sangre desfibrinada de cordero, a concentraciones dobles (0.25, 0.5, 1, 2 y 4.0 µg/mL) de claritromicina, e incubando (incubadora Shel Lab®), a 37°C en ambiente microaerofílico (CO₂ al 10% y 90% de humedad). El crecimiento bacteriano se evaluó tras 72 h, se empleó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* como cepa de control de calidad para monitorear la precisión de la CIM de *H.pylori* al usar el método de dilución en agar, considerando para esta cepa puntos de corte de CIM <0.015 µg/mL como sensible y >0.12 µg/mL como resistente a la claritromicina. Los valores de crecimiento y resultado de la susceptibilidad se consignaron en documentos de Excel, donde se designó el código de la muestra y el valor de la CIM.

3.2.7 Prueba de aliento [¹³C]-Urea.

Esta prueba no invasiva (Ricci et al, 2007) se realizó para determinar la resolución de la infección tras la aplicación de tratamiento de erradicación, conformado por claritromicina (Genfar®) 500mg 2 v/d y amoxicilina (Genfar®) 1000mg 2 v/d, complementado con Omeprazol (Genfar®) 20mg, 2 veces por día (v/d) por 14 días, antes del desayuno y cena. El tratamiento se suministró a los participantes de Tumaco y Túquerres dentro del marco del proyecto titulado “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica”, (Contrato Colciencias No 1106-408-20549). Dentro de este, transcurridos 45 días, de finalizado el tratamiento, se tomó la prueba aliento [¹³C]-Urea; para lo cual se colectó una muestra de aliento de paciente antes de suministrarle [¹³C]-Urea disuelta en jugo de naranja, transcurridos 30 minutos después de la ingesta del jugo, se tomaron 3 muestras de aliento. Se evaluó la relación (t30) [¹³C/¹²C] (delta) con respecto a la línea de base de (t0) [¹³C/¹²C]. En el paciente se consideró fracaso en la erradicación de *H. pylori*, cuando se presentaron a valores iguales o mayores a 5‰ (partes por mil).

3.2.8 Análisis de secuencias

Para el análisis de las secuencias se emplearon el software: Excel, Bioedit y bloc de notas.

Cada secuencia se le designó un código de identificación para la población To/Ts (Tumaco/Túquerres) seguido por el número de muestra. Los archivos de secuencia .Ab1 se evaluaron en el software bioedit, en el cual se eliminaron los nucleótidos N, y se ensambló la secuencia consenso a partir de las secuencias sentido y anti sentido. Los cambios en la secuencia se evaluaron mediante alineamiento local con la secuencia código genbank: U27270 en el caso de *23S rRNA* y AE000511.1 en el caso de *pbp1A*, ambas secuencias corresponden al genoma de la cepa de *H. pylori* 26695. Se exportó el alineamiento en formato fasta y abrió en bloc de notas; la información se copió y pegó en un libro de Excel donde se adicionó la fórmula lógica (DatoX =Dato Y)*1, la cual presentó valores de 0 datos diferentes entre las secuencias alineadas y 1 para datos iguales. Para cada muestra se determinaron los cambios. Para las muestras de *pbp1A*, adicionalmente se tradujo el ADN a proteína en el software bioedit y se realizó el mismo análisis para determinar los cambios.

3.2.9 Análisis estadístico

Se estimó la frecuencia y proporción de aislados susceptibles y resistentes de la población de Túquerres. El rendimiento de la amplificación y secuenciación de los fragmentos de los genes *23S rRNA* y *pbp1A* se evaluó mediante análisis descriptivos. Se estimó la frecuencia de las mutaciones en los genes; para el caso de *23S rRNA* se evaluó la relación entre las mutaciones y el fenotipo resistente mediante la prueba de Riesgo relativo en SPSS versión 15 en español. Para las variables de prueba de aliento y mutaciones en gen *pbp1A* solo se realizaron análisis descriptivo, por el bajo número de muestras al comparar la resistencia *in-vivo* con *in-vitro* (entre 0 a 3 datos).

4. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN EL DOMINIO V DEL GEN *23S rRNA* EN AISLADOS DE *Helicobacter pylori* RESISTENTES A CLARITROMICINA PROVENIENTES DE LAS POBLACIONES DE TUMACO Y TÚQUERRES (NARIÑO -COLOMBIA)

4.1 RESUMEN

La erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica es considerada un método de quimioprevención del desarrollo de cáncer gástrico, para lo cual se emplea la terapia triple que consiste en la administración de dos antibióticos: claritromicina, amoxicilina y un inhibidor de protones. El fracaso de la terapia de erradicación se ha asociado a la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina, donde la resistencia se ha atribuido a mutaciones en el dominio V del gen *23S rRNA*. Se evaluó la resistencia a claritromicina por el método de Dilución en Agar en 147 aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres. Se emplearon 76 aislados de *H. pylori* para la amplificación por PCR y secuenciación del gen *23S rRNA* (59 de Tumaco y 17 de Túquerres), se estimó la frecuencia de las mutaciones y su asociación con el fracaso de erradicación determinada por la prueba de aliento [C^{13}]-Urea. Se observó resistencia a claritromicina en 3.4 % (5/147) de los aislados *H. pylori* de Túquerres. Se logro amplificar en 58/76 aislados (41 de Tumaco y 17 de Túquerres) de *H.pylori* el domino V del gen *23S rRNA*, a los cuales se les caracterizaron las mutaciones. Se encontraron mutaciones en las secuencias del 57% (33/58) de los aislados, el 51% (13 aislados de Tumaco y 4 de Túquerres) con mutaciones fueron resistentes y el 49% susceptibles (10 de Tumaco y 6 de Túquerres) a claritromicina. Se presentaron los cambios T2183C y C2196T en un aislado resistentes de Tumaco y de Túquerres respectivamente. Los cambios A1653G, C1770T, C1954T, A1593T/T2183C y G1827C/C2196T se presentaron únicamente en aislados resistentes de Tumaco; y el cambio A2144G solo en un aislado de Túquerres. Se observó que las mutaciones en el dominio V del gen *23S rRNA*, en los aislados de *H. pylori* incrementaron la probabilidad de un fenotipo resistente a claritromicina en un 24%, respecto a un incremento de 60% en los aislados provenientes de Túquerres, donde todas las mutaciones se presentaron en el dominio V del gen

23S *rRNA*. Las mutaciones T2183C, A2144G y C2196T son reportadas por primera vez para aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina de Colombia, no se observó asociación entre las mutaciones y el fracaso de erradicación. La resistencia en los aislados que no presentaron mutaciones puede estar asociada a mutaciones fuera del rango evaluado o la presencia de bombas de eflujo para la claritromicina. Se requiere evaluar la posible relación de las mutaciones no descritas y la resistencia a la claritromicina; adicionalmente se requiere evaluar un número mayor de poblaciones con el fin conocer las mutaciones presentes y su frecuencia, dado el tamaño de muestra reducido empleado en esta investigación.

Palabras Clave: Dominio peptidiltransferasa, claritromicina, resistencia *in-vitro*, mutación puntual, fracaso terapéutico

3.2 INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial, siendo más prevalente en países en desarrollo (Bravo et al. 2003, Barile et al 2010, Serrano 2009 y Vallejos et al 2007). Esta se adquiere en la niñez y puede persistir a lo largo de la vida si no es tratada; su persistencia hasta la adultez se asocia con la aparición de patologías gástricas como: gastritis crónica, úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma tipo MALT (IARC, 1994; Blaser y Atherton, 2004; Rubiano y Velásquez, 2007; Henao et al, 2009; McColl, 2010). En Colombia coexisten regiones de alto y bajo riesgo para desarrollo de cáncer gástrico con una incidencia de 150 y 2.5 casos por 100.000 pers-año. Las razones que pueden explicar este contraste se desconocen. Sin embargo, se ha logrado establecer que es independiente de la prevalencia de infección por *H. pylori*, siendo esta cercana al 90% en ambas poblaciones (Cortez et al, 2012).

La erradicación del *H. pylori* de la mucosa gástrica es el pilar fundamental en el tratamiento de entidades como la gastritis crónica, úlcera péptica, gastritis atrófica, displasia y

metaplasia (Bayerdorffe et al, 1995; Sugiyama, 2002; Mera et al, 2006). El tratamiento de primera línea recomendado por el consenso de Masstricht III (Malfertheiner et al, 2007) para su erradicación, es la triple terapia que consiste en un inhibidor de bomba de protones acompañado de claritromicina y amoxicilina o metronidazol. En todos los casos, la meta es lograr la resolución de la infección en al menos 90% de los pacientes tratados,(Gerrist et al, 2006; Vakil y Megraud, 2007; Graham y Shiotani, 2008; Rimbara et al, 2011) no obstante, el fracaso terapéutico es inherente y puede atribuirse a múltiples factores (humanos y bacterianos) entre ellos: dosis inadecuadas de los medicamentos, insuficiente tiempo de uso o abandono del tratamiento, disminución de su actividad por interacciones con otras sustancias, pronta reinfección de los pacientes tratados con éxito, aparición de cepas resistentes a los antibióticos, principalmente a claritromicina (Tankovic et al, 2001; Cover y Blaser, 2009); esta resistencia en *H. pylori* reduce la tasa de erradicación, del 86% estimada para la terapia triple a valores de entre 20% a 40% (Gisbert y Pajares, 2001; Bruce y Maaroos, 2008). Entre las principales causas de la resistencia a la claritromicina en *H. pylori* por la presencia de mutaciones en el dominio V del gen *23S rRNA*, entre las más frecuentes se describen: A2142G, A2142C y A2143G (Versalovic et al, 1997; Rimbara et al, 2011;Liu et al, 2008) C2227T (Hu et al, 2009), T2182C (Mogg et al, 2008), C2244T (Qing et al, 2004; Ribeiro et al, 2003), A2115G, A2144G (Matsumura et al, 2001), G2223A, T2288C, T2711C (Rimbara et al, 2007) G1939A, G2141A, C2147G, G2224A y T2215C (Dos Santos et al, 2010). Estas mutaciones inhiben la unión de la claritromicina al dominio V en el *23S rRNA* de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y le permiten a la bacteria continuar con las síntesis proteica (Retsema y Fu, 2001).

En Colombia, la resistencia a claritromicina varía entre y dentro regiones, así lo demuestran estudios previos con prevalencias de publicados por 63.1%(Yepes et al, 2008) 17.7%(Trespacios et al, 2010) y 15% (Henao et al, 2009) solo para Bogotá (Andes colombianos), una región de alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. El contraste geográfico en el riesgo de cáncer gástrico y la variabilidad regional en la prevalencia de resistencia a claritromicina, representa una oportunidad única para el estudio de las mutaciones puntuales en el gen *23S rRNA* de *H. pylori*.

4.3 OBJETIVO

Caracterizar las mutaciones presentes en el *dominio V* del gen *23S rRNA* y su asociación con la resistencia *in-vitro/vivo* a claritromicina en aislados de *H. pylori* de pacientes provenientes de Tumaco y Túquerres.

4.4 METODOLOGÍA

La resistencia antimicrobiana a la claritromicina se evaluó por el método de dilución en agar en 147 aislados de *H. pylori* provenientes de Túquerres. Para detectar las mutaciones en el gen *23S rRNA* se tomaron 59 aislados de la población de Tumaco (29 resistentes y 30 susceptibles) y 12 aislados susceptibles y los resultantes resistentes de la población de Túquerres. Se buscaron en los registros positivos para la prueba en aliento [¹³C]-Urea, los aislados resistentes *in-vitro*, con el fin de determinar la asociación entre las mutaciones y el fracaso terapéutico.

4.4.1 Amplificación del dominio V del gen *23S rRNA* en *H. pylori*.

La caracterización de las mutaciones asociadas a la resistencia a claritromicina en *H. pylori* se realizó mediante la amplificación por PCR del dominio V en el gen *23S rRNA*. La reacción se realizó en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco), adicionando los siguientes reactivos a un tubo de 0.2 mL: buffer 1X (Buffer green 5X Promega®), MgCl₂ 1μM (Promega®), DMSO 10%, dNTPs 0.288mM (Promega®), 50 pmol/μL de cada cebador (posición de inicio 1585, 5'-GATTGGAGGGAAGGCAAT-3' -CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-5 posición final 2247) los cuales se diseñaron empleando el software Primer3 V 0.4.0 (Rozen S y H J. Skaletsky), 0.5 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega®); y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 50 μL. El ciclo térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C/2 min, seguida de 35 ciclos [95 °C/1 min, 54°C/1 min, 59°C/1 min y 72 °C/1 min] y una extensión final a 72 °C/15 min. Los productos de amplificación fueron obtenidos por electroforesis de a 80 voltios por 1h en una cámara horizontal (spectroline bio-o-visión®). Estos se visualizaron mediante fluorescencia de luz U.V. (260/280 nm) en un transiluminador (spectroline bio-o-visión®) en geles de agarosa (sigma®) al 2% teñida con 1μL de bromuro de etidio (0.5μg/ml). El tamaño del amplificado fue de aproximadamente 662 pb (fragmento esperado

mediante el análisis en silico y correspondiente a la banda del marcador de peso).

4.4.2 Purificación de amplificados.

Se tomó 43µL del amplificado de cada una de las muestras, y adicionó 9µL de EXOSAP-IT®. El EXOSAP-IT® consiste en dos enzimas hidrolíticas, la exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón, recombinante (rSAP por su siglas en ingles *Shrimp Alkaline Phosphatase, Recombinant*), en un tampón. La exonucleasa I elimina los residuos de cebadores presentes en cadena sencilla y cualquier ADN de una sola hebra extraña producida en la PCR. La rSAP elimina el resto de los dNTP a partir de la mezcla de PCR. Para que la actividad enzimática del EXOSAP-IT® se lleve a cabo, se incubaron los amplificados de PCR a 37°C/15 min, y se inactivaron las enzimas a 80°C/15 min. Los amplificados purificados se almacenaron a -10°C.

4.4.3 Secuenciación e identificación de mutaciones.

El amplificado purificado se secuenció en ambos sentidos (forward y reverse) empleando el analizador genético de la Universidad del Valle (ABI 3130 Applied Biosystem®), y la metodología *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem®), conforme a las condiciones estandarizadas en el laboratorio de Genética Molecular Humana. Se empleó el software Bioedit v 7.1.11® (Hall, 1999), en la edición y alineamiento de las secuencias. Los cambios en las secuencias se cotejaron mediante el alineamiento local, con la secuencia referencia para el gen 23S rRNA código GenBank: U27270.1 (Taylor et al, 1997).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Población

Para determinar la población de estudio de esta investigación, se evaluó la resistencia antimicrobiana a claritromicina *in-vitro* mediante el método de dilución en agar a 147/149 aislados de *H. pylori* provenientes de pacientes de Túquerres. Se observó que a partir de 147 aislados de *H. pylori* evaluados, 142 (96.6%) fueron susceptibles y 5 (3.4%) presentaron resistencia *in-vitro* a claritromicina; de los aislados resistentes 3 (60%) y 2 (40%) provinieron de mujeres y hombres respectivamente; y donde 1, 2 y 2 aislados se obtuvieron a partir de pacientes en los rangos etarios de 19-35, 36-47 y 48-65 años respectivamente (Tabla 5).

Tabla5. Características demográficas de los preservados de *H. pylori* de pacientes de Túquerres a los cuales se les evaluó la susceptibilidad *in-vitro* a claritromicina.

Claritromicina	
Susceptible	142 (96.6)
Resistente	5 (3.4)
Total	146 (100.0)
Edad (años)	
19-35	1(20.0)
36-47	2(40.0)
48-68	2(40.0)
Sexo	
Masculino	3(60.0)
Femenino	2(40.0)

En la tabla 5, se observa el número de aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a claritromicina *in-vitro*, adicionalmente se observan el rango etario y género de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron los aislados resistentes. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la característica.

La población que se empleó para amplificar y secuenciar el dominio V del gen *23S rRNA* correspondió a un total de 76 aislados de *H. pylori* en línea de base para las poblaciones de Tumaco y Túquerres; de estos 17 correspondieron a aislados de Túquerres, de los cuales 5 fueron resistentes y 12 susceptibles a claritromicina *in-vitro*, y 59 aislados provenientes de Tumaco, de los cuales 30 fueron susceptibles y 29 resistente a la claritromicina *in-vitro*. Los aislados de *H. pylori* susceptibles de la población, se seleccionaron al azar, a partir del total

de los aislados susceptibles de la *línea de base*.

4.5.2 Amplificación y secuenciación del dominio V del gen 23S rRNA de *H. pylori* de aislados de Tumaco y Túquerres.

Se realizó la amplificación y secuenciación de un fragmento de 662pb (Figura 2), entre el nucleótido 1585 y 2247 que correspondió al dominio V del gen 23S rRNA de *H. pylori*. Se realizó la amplificación por PCR exitosamente en 58/76 (76.32%) de los aislados de *H.pylori*; de los cuales 41/59 (69.49%) correspondieron a aislados de Tumaco, y donde 21/41(52.50%) fueron resistentes y 20/41 (47.75%) susceptibles, y 17 aislados (12 susceptibles y 5 resistentes), que correspondieron a la población de Túquerres los cuales amplificaron en su totalidad (Tabla 6).

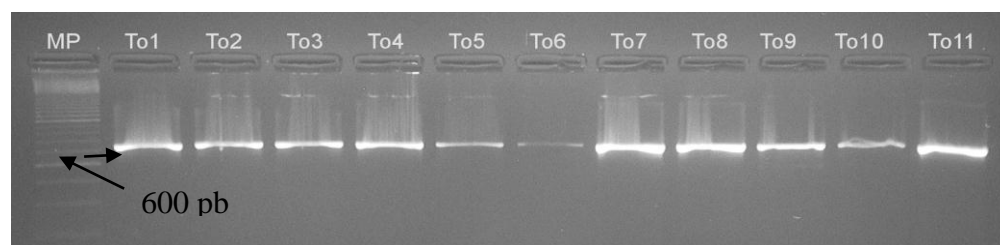


Figura 2. Amplificación del dominio V del Gen 23S rRNA en aislados de *H. pylori*.

En la figura MP corresponde al marcador de peso de 100pb, la flecha señala la banda correspondiente a 600pb; los carriles To1 al To11, corresponden a cepas resistentes de la población de Tumaco. Solo las muestras que mostraron amplificación fueron secuenciadas.

Tabla 6. Rendimiento de la amplificación por PCR del dominio V del gen 23S rRNA de *H. pylori* en las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

Aislados de <i>H. pylori</i>	Tumaco	Túquerres	Total
Evaluados			
Susceptibles	30 (50.8)	12(70.6)	42(55.3)
Resistentes	29(49.2)	5(29.4)	34(44.7)
Total	59(100.00)	17(100.00)	76(100.00)
Amplificados			58 (76.3)
Susceptibles	21(52.5)	12(70.59)	33(56.9)
Resistentes	20(47.5)	5(29.41)	25(43.1)
Total	41(100.0)	17(100.00)	58(100.00)

En la tabla 6, se observa el número de aislados de *H. pylori* en *línea de base* susceptibles y resistentes a claritromicina *in-vitro*. Se denominó evaluados al total de los aislados de *H. pylori* de ambas poblaciones a partir de los cuales se amplificó el dominio V del gen 23S rRNA, y amplificados, a los aislados de *H. Pylori* de ambas poblaciones en los que fue posible amplificar el fragmento, el valor se observa en negrita en la casilla total. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la característica.

4.5.3 Análisis de mutaciones

4.5.3.1 Mutaciones en las secuencias de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco: en la población de Tumaco se evaluaron 41 secuencias del dominio V del gen *23S rRNA* de *H. pylori*. Se presentaron cambios en la secuencias de 13/21 (62%) de los aislados resistentes y en 10/20 (50%) secuencias de aislados susceptibles. Al realizar el análisis de riesgo relativo, con el fin de determinar si las mutaciones en el dominio V del gen *23S rRNA* de *H. pylori* incrementaban la posibilidad de un aislado a presentar resistencia a claritromicina *in-vitro*, se observó que las mutaciones en este dominio incrementan en un 24% la posibilidad de que un aislado presente un fenotipo resistente en condiciones *in-vitro* (Tabla 7).

Tabla 7. Relación de los cambios en el dominio V del gen *23S rRNA* y la susceptibilidad *in-vitro* a claritromicina de aislados de *H. pylori* provenientes de Tumaco.

	Tumaco n=41		Total	R.R (IC= 0.7129 -2.1501)
	M	S		
Susceptibles	10(50)	10(50)	20(100)	R.R.= 1.24
Resistentes	13(62)	8(48)	21(100)	<i>p</i> =0.4482
Total	23	18	41	

En la tabla 7, las letras M y S corresponden a aislados de *H. pylori* con mutaciones y sin mutaciones en el gen *23S rRNA* respectivamente. Los valores en paréntesis hacen referencia al porcentaje de la característica. Se observa el valor de la prueba de riesgo relativo, el intervalo de confianza (IC) y el valor de probabilidad *p*

4.5.3.2 Cambios presentes en los aislados de *H. pylori* de Tumaco: En las secuencias del dominio V del gen *23S rRNA* de aislados de *H. pylori* provenientes de Tumaco, se observaron en total 16 cambios; de los cuales las mutaciones: A1653G, C1770T, C1954T, T2183C, A1593T/T2183C y G1827C/C2196T se presentaron solo en aislados resistentes. El cambio A1653G se observó en aislados que presentaron crecimiento a concentraciones de claritromicina de 2 y 4 µg/mL, los cambios C1770T,

A1593T/T2183C y G1827C/C2196T a concentraciones de 1 µg/mL y los cambios C1954T y T2183C a concentraciones de 4 µg/mL del antibiótico (Tabla 8).

Tabla 8. Cambios en las secuencias de 23S rRNA de *H. pylori* de Tumaco y la susceptibilidad a claritromicina.

n	Aislamiento de <i>H. pylori</i>	CIM µg/mL	Mutaciones en 23S rRNA	Aislamiento de <i>H. pylori</i>	CIM µg/mL	Mutaciones en 23S rRNA
Resistentes			Susceptibles			
1	138	1	A1593G/*T2183C	S17	LB	A1822G/G1827A/G1941A/T1831C
2	60	4	A1653G	S94	LB	T1645C
3	64	2	A1653G	S96	LB	A1739G
4	4	4	A1739G/*C1954T/G1695A	S97	LB	T1645C
5	65	1	A1739G/*C2196T/*G1827C	S98	LB	C1632T
6	42	1	A1822G/G1827A/T1831C	S101	LB	A1822G/G1827A/T1645C/T1831C
7	102	2	A1822G/G1827A/T1831C	S103	LB	C1632T
8	174	1	A1822G/G1827A/T1831C	S107	LB	A1667G/T1668C
9	88	>4	C1632T	ATCC 700392	LB	A1593G
10	107	1	*C1770T	ATCC 500392	LB	A1667G/T1668C
11	36	2	T1645C	S 4	LB	NM
12	38	1	T1645C	S 5	LB	NM
13	6	4	*T2183C/A1593T/A1822G/G1827A/T1831C	S 89	LB	NM
14	15	>4	NM	S 93	LB	NM
15	33	2	NM	S 95	LB	NM
16	69	1	NM	S 99	LB	NM
17	91	4	NM	S 100	LB	NM
18	101	2	NM	S 104	LB	NM
19	26	>4	NM	S 105	LB	NM
20	99	1	NM	S 106	LB	NM
21	106	4	NM			

En la tabla 8, se observa la totalidad de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco, los aislados susceptibles se denotan con la letra S y en la casilla CIM (concentración mínima inhibitoria), se observa el valor de concentración de la claritromicina en la cual se presentó crecimiento del aislado, en el caso se los aislados sensibles se observa las letras LB que

corresponde a *Línea de Base*. Las letras NM se interpretan como secuencias sin mutaciones y la casilla *n* al número de aislados. En la casilla mutaciones del 23S *rRNA* se observan los cambios que presentó la secuencia de cada aislado. El * señala las mutaciones únicas en aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina *in-vitro*.

4.5.3.3 Mutaciones en las secuencias de los aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres: en la población de Túquerres se amplificó el dominio V del gen 23S *rRNA* en 17 aislados de *H. pylori* de los cuales 12 fueron susceptibles y 5 resistentes a claritromicina en condiciones *in-vitro*. De los aislados resistentes 4/5 (80%) presentaron mutaciones en su secuencia, al igual que 6/12 (50%) aislados susceptibles a claritromicina *in-vitro*. Al realizar el análisis de riesgo relativo, con el fin de determinar si las mutaciones en el dominio V del gen 23S *rRNA* de *H. pylori* incrementaban la posibilidad de una aislado a presentar resistencia a claritromicina *in-vitro*, se observó que la mutaciones en este dominio incrementan en un 60% la posibilidad de que un aislado presente un fenotipo resistente en condiciones *in-vitro* en esta población (Tabla 9).

Tabla 9. Relación de los cambios en el dominio V del gen 23S *rRNA* y la susceptibilidad *in-vitro* a claritromicina de aislados de *H. pylori* provenientes de Túquerres.

	Túquerres n=17		Total	R.R (IC 0.7822- 3.2730)
	M	S		
Susceptibles	6(50)	6(50)	12 (100)	R.R.= 1.60
Resistentes	4(80)	1(20)	5(100)	<i>p</i> =0.1980
Total	10	7	17	

En la tabla 8, las letras M y S corresponden a aislados de *H. pylori* con mutaciones y sin mutaciones en el gen 23S *rRNA* respectivamente. Se observa el valor de la prueba de riesgo relativo, el intervalo de confianza (IC) y el valor de probabilidad *p*. Los valores en paréntesis hacen referencia al porcentaje de la característica.

4.5.3.4 Cambios presentes en los aislados de *H. pylori* de Túquerres: al evaluar las secuencias del dominio V de los aislados de *H. pylori* provenientes de la población de Túquerres; se observaron 11 cambios diferentes, de los cuales las mutaciones C2196T,

T2183C y A2144G se observaron en aislados resistentes, que crecieron a concentraciones de 1, 1 y 2 µg/mL de claritromicina respectivamente (Tabla 10)

Tabla 10. Cambios presentes en las secuencias de gen 23S rRNA de *H.pylori* de Túquerres y la susceptibilidad a claritromicina.

n	Aislamiento de <i>H. pylori</i>	CIM µg/mL	Mutación en 23S rRNA
Resistentes			
1	323	1	A1593G/A1822G/G1827A/T1645C/T1831C/*T2183C
2	336	1	A1593G/*C2196T
3	399	2	*A2144G/G1827A
4	440	4	A1822G/G1827A/G2221A/T1831C
5	433	4	NM
Susceptibles			
1	S351	LB	A1822G/G1827A/T1831C
2	S377	LB	A1822G/G1827A/G2221A/T1645C/T1831C
3	S394	LB	A1593G
4	S457	LB	A1822G/G1827A/G2221A/T1831C
5	S467	LB	A1739G/G1695A
6	S513	LB	A1822G/G1827A/T1831C
7	S470	LB	NM
8	S530	LB	NM
9	S404	LB	NM
10	S409	LB	NM
11	S454	LB	NM
12	S004	LB	NM

En la tabla 9, se observa la totalidad de los aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres, los aislados susceptibles se denotan con la letra S y en la casilla CIM (concentración mínima inhibitoria), se observa el valor de concentración de la claritromicina en la cual se presentó crecimiento del aislado, en el caso se los aislados sensibles se observa las letras LB que corresponde a *Línea de Base*. Las letras NM se interpretan como secuencias sin mutaciones y la casilla n al número de aislados. En la casilla mutaciones del 23S rRNA se observan los cambios que presentó la secuencia de cada aislado.

4.5.5 Análisis de la relación entre la resistencia *in-vitro* y el fracaso de erradicación

in-vivo de *H. pylori*.

Con la finalidad de establecer una posible asociación entre la resistencia *in-vitro* y el fracaso del tratamiento en los pacientes; se emplearon las muestras resistentes *in-vitro* a claritromicina (29 de Tumaco y 5 de Túquerres) y se compararon con las positivas para la prueba de aliento mediante [¹³C]-Urea. En total se empleo la información de 51 pacientes con la prueba de aliento positiva, de los cuales 25 fueron de Tumaco y 26 de Túquerres (Tabla 11).

Tabla 11. Relación de aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a claritromicina y el fracaso de erradicación en pacientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

Tumaco						Túquerres					
n	Codigos de aislados resistentes					n	Codigos de pacientes con fracaso				
29	4	33	60	88	107	25	1	59	117	151	196
	6	36	64	91	138*		35	66	126	159	
	15	38	65	99	154		46	78	127	160	
	16	42	69	101	174		49	82	129	184	
	24	43	71	102*	186		52	102*	137	185	
	26	45	86	106*			56	106*	138*	193	
						5	323	336	399	440	433*
						26	308	368	431	471	525
							313	377	436	480	526
							314	389	441	492	
							318	433*	444	509	
							346	416	445	512	
							355	430	460	513	

En la tabla 11, se observan los códigos para los aislados resistentes a claritromicina *in-vitro* y los códigos asignados a los pacientes con fracaso en la erradicación de *H. pylori*. En esta resistencia, corresponde a los aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a claritromicina y fracaso a los códigos de los pacientes positivos para la prueba de aliento [¹³C]-Urea. El * corresponde a los aislados comunes en ambos grupos. El esquema de erradicación, la terapia de erradicación y los datos de la prueba de aliento fueron tomados en el proyecto Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica.

En total se observó resistencia a la claritromicina *in-vitro* y fracaso en la erradicación en los pacientes con código 102, 106, y 138 de Tumaco y 433 en

Túquerres. Por lo cual de los 21 aislados resistentes de Tumaco, donde se evaluaron las secuencias del dominio V del gen *23S rRNA*, se observó fracaso en dos aislados con mutaciones y un aislado sin mutaciones; en la población de Túquerres se observó fracaso en un aislado de *H. pylori* sin mutación en la secuencia (Tabla 12).

Tabla 12. Asociación entre las mutaciones en el gen *23S rRNA* y el fracaso terapéutico en las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

	Tumaco		Túquerres	
	<i>In-vitro</i>	Aliento	<i>In-vitro</i>	Aliento
Mutantes	8	2	4	0
Sin mutación	13	1	1	1
Total	21	3	5	1

En la tabla 12, *in-vitro* se refiere a los aislados de *H. pylori* que crecieron a concentraciones ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ de claritromicina, *aliento* corresponde a la prueba en aliento $[^{13}\text{C}]\text{-Urea}$ realizada 45 días después de finalizado el tratamiento en el proyecto macro. Se designa mutantes a los aislados que presentaron mutaciones en la secuencia del gen *23S rRNA* y sin mutación a los aislados que no presentaron cambios.

4.5.6 Localización de las mutaciones en el gen *23S rRNA*.

El *23S rRNA* posee 6 dominios; el primer dominio (I) se encuentra entre el nucleótido 1-478, el dominio dos (II) entre el nucleótido 478-1188, el dominio tres (III) entre el nucleótido 1188-1562, el dominio cuatro (IV) entre el nucleótido 1562-1931, el dominio cinco (V) entre el nucleótido 1931-2541 y el dominio seis (VI) entre el nucleótido 2541-2820. Se observó que las mutaciones en los aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina de Tumaco se encontraban en los dominios V, con las excepciones de los cambios C1770T, A1593T y G1827C que se presentaron en el dominio IV, donde se observan los cambios presentes en los aislados susceptibles de ambas poblaciones, con la única excepción del cambio G2221A. Todos los cambios presentes en los aislados *H. pylori* resistentes a claritromicina *in-vitro* de la población de Túquerres se presentaron en el dominio V del gen *23S rRNA* (Tabla 13).

Tabla 13. Localización de los cambios en las secuencias de *H. pylori* en los dominios gen 23S *rRNA*.

	Dominio IV 1562-1931	Dominio V 1932-2541
RESISTENTES		
Tumaco		
A1653G	x	
C1770T	x	
C1954T		x
T2183C		x
A1593T/T2183C	x	x
G1827C/ C2196T	x	x
Túquerres		
C2196T		x
T2183C		x
A2144G		x
Susceptibles		
A1593G	x	
A1667G	x	
A1739G	x	
A1822G	x	
C1632T	x	
G1695A	x	
G1827A	x	
G1941A	x	
G2221A		x
T1645C	x	
T1668C	x	
T1831C	x	

En la tabla 13, se observan las mutaciones presentes solo en aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina *in-vitro* de las poblaciones de Tumaco y Túquerres. En el apartado susceptibles las mutaciones presentes en aislados susceptibles de ambas poblaciones.

4.6 DISCUSIÓN

4.6.1 Susceptibilidad *in-vitro* a claritromicina

Los estudios orientados a evaluar la susceptibilidad de *H. pylori* a claritromicina en Colombia son escasos; estos difieren, en la metodología de análisis de la susceptibilidad y en la prevalencia de la resistencia. En esta investigación la prevalencia de la resistencia a claritromicina en los aislados de *H. pylori* provenientes de la población de Túquerres fue del 3.4% (5/147); valor similar a las proporciones descritas en eje cafetero (Pereira, Armenia y Manizales), donde se observaron prevalencias de la resistencia de 2.2%(2/88) y 3.8% (4/106) mediante la técnica de *E-test* (Alvares et al, 2009a y b). Este valor es bajo si se compara con los observados en estudios previos; en la ciudades de Bogotá, donde se registraron valores de resistencia del 15% (7/46)y 60% (50/84) mediante la técnica de difusión en disco (Henao et al, 2009; Yepes et al, 2008); y de 17.72% (14/79) mediante la técnica de *Etest* (Trespacios et al, 2010), y observado en el proyecto macro para la población de Tumaco-Nariño donde la prevalencia fue del 19.8% (29/147) mediante el método de dilución en agar (Figuerola et al, 2012).

La variación en la prevalencia de la resistencia que se observa pudiera estar asociada a la técnica empleada, ya que, se considera que en referencia al método de dilución en agar, el *E-test* presenta una variación entre al 10-20%, sin embargo esto no explicaría la variación entre las localidades de Tumaco y Túquerres 19.8% vs 3.4% (Megraud F, 2004; Secka et al, 2012). La variación puede ser explicada por la exposición previa a este antibiótico por infecciones respiratorias las cuales son consideradas un problema de salud publica en la ciudad de Tumaco, y donde se han incluido dentro de plan de desarrollo de la ciudad (Plan de atención de la primera infancia de Tumaco 2011); estas infecciones se presentan en edades tempranas y su tratamiento puede incluir macrolidos o betalactamicos (UAE-CRES, 2011) lo cual puede generar resistencia cruzada en *H. pylori* por exposición a estos antibióticos, en casos de neumonía no especificada la cual registro 899 casos para el año 2011 (Perfil epidemiológico de Tumaco, 2012), sin embargo la claritromicina en no se encontraba incluida en los planes obligatorios de salud hasta el 2011 (UAE-CRES, 2011;

Alvares et al, 2009 b; Figueroa et al, 2012).

Al considerar la prevalencia de la resistencia a claritromicina en *H. pylori* encontrada en la población de Túquerres, esta se puede considerar baja para el promedio en América el cual se registra 29.3% y los valores promedios de 11.1% en Europa, 44% en África y de 18.9% en Asia, el cual es similar al registrado en Tumaco 19.8% (De Francesco et al, 2010; Wu et al, 2012). Al considerar las regiones se observa variación en la prevalencia obtenida en las diferentes investigaciones con valores bajos entre 0 a 8 % (Eisig et al, 2011; Gao et al, 2012; Seck et al, 2011;) y registros que van de 14.3% a 84.9%(Karczewska et al, 2011; Binh et al, 2013; Cuadrado et al, 2012; Sarancino et al, 2012; Liu et al, 2011), teniendo en base estos valores la prevalencia encontrada en Túquerres para la claritromicina , puede ser considerada baja (ver anexo 2). Sin embargo los valores en la prevalencia de la resistencia a claritromicina en Tumaco del 19.8% es similar a la prevalencia de 19.5 en Brasil (Ogata et al 2013), donde los aislados se obtuvieron a partir de pacientes con tratamiento previo a la infección de *H. pylori*, esto soporta la hipótesis de mayor prevalencia en la localidad de Tumaco por exposición previa a macrolidos.

El efecto de variación entre regiones de un mismo país, se puede observar en un estudio en Corea del sur, donde se evaluaron 3 localidades encontrando prevalencias en resistencia a la claritromicina de 12.5%(5/40) en *Gyeonggi*, 10%(4/40) en *Kangwon* y de 0% en *Busan* (Kim et al, 2011). Al igual que lo observado en las poblaciones de Tumaco y Túquerres , donde existe contraste en la resistencia a claritromicina 3.4% (5/147) vs 19.8%(29/147) para Túquerres y Tumaco respectivamente; al parecer, el contraste en la susceptibilidad observada en condiciones *in-vitro*, podría estar asociada a la virulencia de las cepas de *H.pylori*; lo que permitiría explicar las diferencias en el contraste en el riesgo a cáncer gástrico; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la genotipos virulentos y la resistencia antimicrobiana (Trespacios et al, 2010).

4.6.2 Mutaciones y resistencia *in-vitro* a claritromicina.

En este apartado se discutirá la posible asociación de las mutaciones observadas en los aislados de *H. pylori* de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, y la resistencia *in-vitro* a la claritromicina. Se le recuerda al lector que los aislados en los cuales se evaluaron las mutaciones fueron los de línea de base como se explica en la metodología general.

En Colombia los estudios sobre las mutaciones en el gen *23S rRNA* y su asociación a la resistencia *in-vitro* en *H. pylori* son escasas, enfocándose en los cambios A2142G, A2143G y A2142C, que son los más frecuentes en estudios en otros países (Van Doorn et al, 2001; De Francesco et al, 2004; Rimbara et al, 2007; Liu et al, 2008; Liu et al, 2011). Los estudios previos en Colombia muestran frecuencias de 7.3% (3/41) para los cambios A2142G y A2143G en pacientes de la localidad de Risaralda (Izasa et al, 2007) y 2.2% (2/88) del cambio A2143G en aislados resistentes de las localidades de Pereira y Armenia (Alvares et al, 2009). En este estudio, no se observaron en ningún aislado de *H. pylori* resistente o susceptible, de los pacientes provenientes de Tumaco y Túquerres, las mutaciones A2142G, A2143G y A2142C. Los resultados observados pueden explicarse por la tendencia de las investigaciones que buscan implementar técnicas de detección rápida de estas mutaciones en particular, con el objetivo de obtener pruebas de evaluación de resistencia a claritromicina en menor tiempo y comparables al cultivo y antibiograma, con este fin se han implementado su detección por PCR -HPLC (Posteeraro et al, 2006), RT-PCR (Oleastro et al, 2003; Schabereiter-Gurtner, 2004), RFLPs (Abadi et al, 2011) y también a que mutaciones como A2143G pudieran ser el resultado de un evento de presión de selección por el antibiótico, como resultado de exposiciones previas a claritromicina (Shen et al, 2005; Kobayashi et al, 2006).

La aplicación de estas técnicas con este propósito y en particular en nuestro país, requiere conocer la frecuencia de otras mutaciones puntuales asociadas a la resistencia como lo son C2227T (Hu et al, 2009), T2182C (Mogg et al, 2008), C2244T (Qing et al, 2004, Ribeiro et al, 2003), A2115G, A2144G (Matsumura et al, 2001), T2182C, G2223A, T2288C, T2711C (Rimbara et al, 2007) G2141A, C2147G, G2224A y T2215C (Dos Santos et al, 2010).

Estas mutaciones que se ha descrito como asociadas a la resistencia a claritromicina, se describen en el dominio V del gen 23S *rRNA*. Los cambios pueden producir alteraciones espaciales inhibiendo el acceso del macrolido por alteraciones hidrofobicas como lo son los cambios A2115G, G2141A, A2142G, A2143G, A2144G; los cambios C2147G, T2711C pueden estar asociados a cambios estructurales en el cambio de T a C, ya esta primera solo cuenta con dos grupos H, para realizar enlaces y se remplaza por C que cuenta con un tercer grupo, que podría formar un alteración de espacio. Esto también se observa en el esquema de 23S *rRNA* con las mutaciones T2182C, T2215C, G2223A, G2224A, C2227T, C2244T y T2288C que participan en la creación de nuevos espacios o cierre de estructuras (Figura 4)

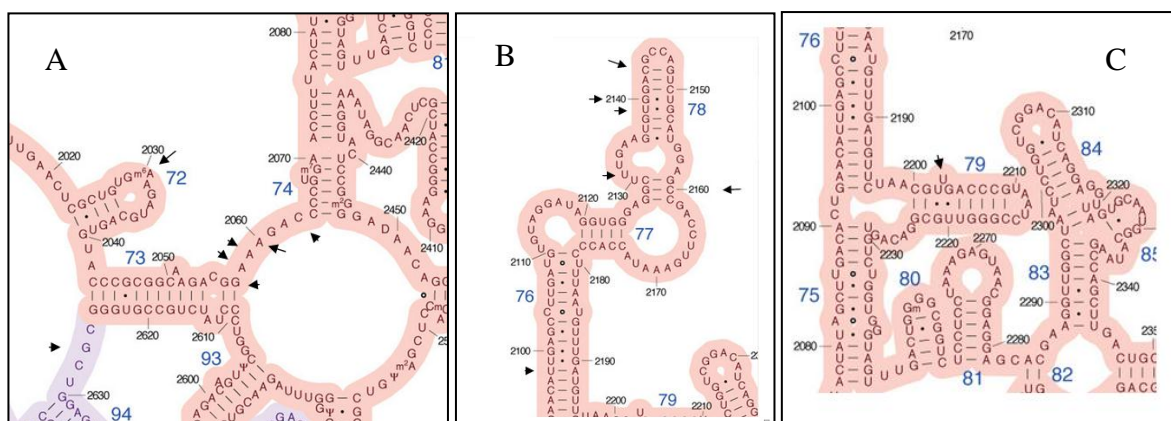


Figura 4. Ubicación de las mutaciones asociadas a claritromicina en *H. pylori* descritas en estudios previos.

En la figura 4, se observa la estructura secundaria del dominio V del 23S *rRNA* de *Escherichia coli*, en este los puntos señalan las mutaciones y los valores entre paréntesis corresponden a la posición en esta especie de la mutación en *H. pylori*. En la sección A se observan (derecha a izquierda) señalados por las flechas los cambios T2711C (2627), A2115G (2031), G2141A (2057), A2142G (2158), A2143G (2159), A2144G (2160), C2147G (2063). En la sección B los cambios T2182C (2098), T2215C (2131), G2223A (2139), G2224A (2140), C2227T (2143), C2244T (2160) se observa que estos alterarían la conformación, creando en algunos casos enlaces no presentes en la secuencia original como G2223A (2139), y G2224A (2140); o eliminando bases unidas como el caso de C2227T (2143) y C2244T (2160). En la sección C se observa el cambio T2288C (2204).

Entre las mutaciones observadas solo en aislados de *H. pylori* resistentes, se encuentra el cambio C2196T en la secuencia 336 (1/5) en Túquerres y 65 (1/21) en Tumaco , en ambas

poblaciones se observó en aislados con crecimiento a 1µg/mL del antibiótico; este cambio no ha sido reportado en ningún país suramericano; siendo reportada en aislados de pacientes Coreanos, en los cuales fracaso el primer tratamiento de erradicación, en estos se identificaron en la secuencia del gen 23S rRNA solo en los aislados resistentes el genotipo A2144G/T2183C/C2196T (Kin, 2007) y que crecieron a concentraciones de 4µg/; y a 11µg/mL en un aislado resistente a la claritromicina que se presento en estudio realizado en la provincia de Guiyang (China),(Shu-mei et al,2012); el número de aislados con la mutación son iguales a los encontrados en nuestro estudio (1 aislado resistente con la mutación por región), adicionalmente los reportes indican su presencia solo en aislados resistentes como se observó en esta investigación, por lo cual se considera este el primer reporte de la mutación en nuestro país y continente. Adicionalmente el cambio se encuentra en el dominio V , en la base una horquilla en *H. pylori* donde se encuentra la base citocina (guanina en *H.coli*), en este cambio se sustituye una base que posee 3 sitios de unión (hidrógenos) por una base que interacciona con dos sitios (hidrógenos), por lo cual se vería afectada la estructura de esta región (Figura 5 B)

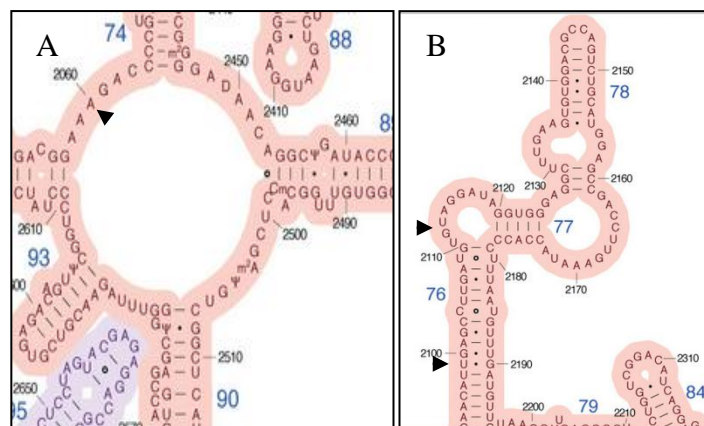


Figura 5. Mutaciones A2144G y C2196T en el 23S rRNA.

En la figura 5, se observa la estructura secundaria del dominio V del 23S rRNA de *Escherichia coli*, en este los puntos señalan las mutaciones y los valores entre paréntesis corresponden a la posición en esta especie de la mutación en *H. pylori*. En la sección A la flecha señala el cambio A2144G (2160) y la sección B el cambio los cambios T2183C (2099) y C2196T (2112).

Otra mutación común a la dos poblaciones fue la T2183C presente en el aislado 323 en Túquerres (1/5) y en el aislado 6 en Tumaco, aislados con crecimiento a 1 y 4 µg/mL de

claritromicina, lo cual sugiere que esta mutación le permite a la bacteria sobrevivir a la acción de la claritromicina. Existen pocos estudios donde se observe mutación T2183C, entre estos se ha descrito, en un estudio realizado en Corea a 73 pacientes, donde se encontró en un aislado resistente, que creció a 1 µg/mL (Kim et al, 2001), en China se observó en 10 aislados resistentes (Shu-mei et al, 2012) y 6 de 16 aislados resistentes en Corea de Sur que crecieron a concentraciones de 2-6 µg/mL (Rhie et al, 2007). Este cambio se encuentra sobre un sitio de doble cadena en el dominio V donde no existe unión por falta de complementariedad ya que las bases nitrógenadas yuxtapuestas en ARN son U=G, y tras la mutación se reemplaza por las bases nitrogenadas por C=G, bases complementarias lo que altera ese sitio en el 23S rRNA (Figura 5B). A pesar de que la mutación T2183C se detectó solo en aislados de *H. pylori* resistentes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, algunos autores consideran que su relación con la resistencia a claritromicina no es clara, ya que se reporta en aislados resistentes y susceptibles (Kin et al, 2001; Hwang et al, 2010). Sin embargo su presencia en aislados que crecieron a concentraciones ≥ 1 µg/mL, afirman su capacidad de inhibir la acción del antibiótico por lo menos en este estudio.

El cambio A2144G se encontró en el aislado de *H. pylori* con código 399(1/5) en la población de Túquerres, el cual creció a una concentración de 2 µg/mL de claritromicina; este cambio no se ha reportado en ninguna de las investigaciones realizadas en Colombia para aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina. Esta mutación desde su descripción se ha asociado claramente con resistencia *in-vitro* a la claritromicina (Versalovic et al, 1997; Momynaliev et al, 2005). La frecuencia de esta mutación varía entre regiones, el valor más similar a lo observado en Túquerres corresponde a un estudio desarrollado en Italia donde se observó la misma frecuencia (Toracchio et al, 2004), el autor señala que la mutación es nueva en la población y pudiese estar asociada con la inclusión de cepas de regiones con alta frecuencia de esta. La mutación presenta frecuencias mayores en regiones como Japón y Turquía donde se registran frecuencias de 0.7 (Kim et al, 2004; Baglan et al, 2006; Çağdaş et al, 2012), cabe recordar que por lo menos en Japón la prevalencia de la resistencia se encuentra entre 11 a 29%. Adicionalmente se ha encontrado en 16 aislados de pacientes inmunosuprimidos (Scarpellini et al, 2002) donde parecen ser las dominantes y donde se

registra el crecimiento de la cepas de *H. pylori* a mas de 2µg/mL.

Las mutaciones A1593G, T1645C, G1695A, A1739G, A1822G, G1827A, T1831C, G1941A, C1954T y G2221A se observaron en aislados resistentes y susceptibles, por lo cual, su asociación a la resistencia al antibiótico no es clara; ya que no se cuenta con reportes previos acerca de las mismas (ver anexo 3). Adicionalmente estas mutaciones se encuentra en el domino IV del gen *23S rRNA*, en el cual no se han descrito mutaciones asociadas a la resistencia a la claritromicina, ya que este no interacciona con el macrolido, y donde la única mutación en el dominio V es G2221A la cual se presento solo en aislados de *H. pylori* susceptibles a la claritromicina y de cual no existen reportes donde se asocie a la resistencia.

Entre las mutaciones presentes solo en aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina *in-vitro*, se encuentran los cambios A1593T y G1827C, los cuales se observaron en los aislados con código 6 y 65 de Tumaco. El aporte de estos a la resistencia alantibiótico, podría ser nula ya que se encuentran en el domino IV del gen *23S rRNA*, y adicionalmente se encontraban en aislados en los cuales se presentaron además los cambios T2183C y C2196T; estos últimos se encuentran en el dominio V y se han observado en aislados resistentes en estudios previos como se describe anteriormente.

Los cambios A1653G, C1770T y C1954T presentes los aislados con código 60, 64, 107 y 4; donde se presentan como únicos candidatos responsables de la resistencia en estos aislados, de los cuales no se registran ningún reporte en la literatura. Su aporte a la resistencia a claritromicina en *H. pylori* no es clara y podría ser nula, ya que se presentan en el domino IV del gen *23S rRNA*.

La ausencia de mutaciones en 36% de las aislados resistentes a claritromicina *in-vitro* puede ser explicado por la presencia de mutaciones fuera de la región amplificada que correspondió a un fragmento comprendido entre las posiciones 1585- 2224. Entre los cambios que se han asociado a la resistencia a claritromicina y que se encuentran fuera de

este fragmento se encuentran T2711C, T2288C (Rimbara et al, 2007) T2289C (Hao et al, 2004), adicionalmente otras mutaciones podrían haber sido eliminadas en la edición de las secuencias, previo el alineamiento como lo es el cambio G2223A (Qing et al, 2004; Ribeiro et al, 2003).

Otro factor que podría explicar, la ausencia a mutaciones en las secuencias de aislados de *H. pylori* resistentes a claritromicina, es el aislamiento de la línea de base. En esta fase se toma el crecimiento bacteriano aislado a partir de la trituración de la biopsia y se transfiere a el medio con suplemento, el preservado se realiza a partir del total de colonias que crecieron en este último, por lo cual podrían existir colonias susceptibles y resistentes en el mismo individuo, y la combinación de estas se emplearon como fuente de ADN; ya que la exposición a este, se convertiría en un efecto de selección que induciría la aparición de mutaciones en las bacterias (Kobayashi et al, 2006), solo cuando el efecto no elimine la totalidad de las bacterias. Sin embargo algunos autores demostraron mediante de análisis con RT-PCR sugiere que las bacterias silvestres y susceptibles crecen en igual proporción en condiciones de laboratorio y por ende se pueden detectar mediante secuenciación (Kargar et al, 2012). Adicionalmente se ha descrito la resistencia natural a este antibiótico en *H.pylori* (Nadenskov-Sorensen et al, 1990; Tsuda et al, 1993) y la presencia de bombas de eflujo que le permiten sobrevivir a concentraciones mayores a 4 µg/mL de claritromicina (Hirata et al, 2010); la presencia de estas estructuras en los aislados de Tumaco y Túquerres no se evaluó en este estudio.

Al observar los valores de resistentes en condiciones *in-vitro*, y lo observado *in-vivo* (medido por la prueba de aliento [13C]-Urea), se observó que solo tres aislados en la población de Tumaco y uno en la población de Túquerres fueron positivos a las dos pruebas; y solo un aislado de estos presentó la mutación T2183C, que solo se observó en aislados resistentes, por lo cual en este estudio esta mutación estaría asociada al fracaso en la erradicación. Los valores de resistencia *in-vitro* e *in-vivo*, pueden ser afectados por características propias de los antimicrobianos, en el caso la claritromicina su efecto puede ser disminuido por la ingesta de alimentos en grandes cantidades después de su

administración o simultáneamente, y en casos donde la persona consume clindamicina y lincomicina, los cuales disminuyen su biodisponibilidad según lo descrito por técnicas químicas. Adicionalmente la prueba de aliento $[^{13}\text{C}]$ -Urea, puede estimar falsos positivos, si los pacientes ingieren inhibidores de bombas de protones, los cuales son usualmente ingeridos para reducir la producción de ácido y efecto de este. (Kearney, 2003)

3.7 CONCLUSIONES

Se observó que el método de amplificación por PCR y secuenciación del fragmento del dominio V del 23S *rRNA* de *H. pylori*, tuvo mayor rendimiento en la población de Túquerres donde se evaluaron el 100% de los aislados, respecto a un rendimiento del 69.46% en los aislados de Tumaco.

La presencia de valores menores al 10% en la resistencia antimicrobiana *in-vitro* a claritromicina, presente en los aislados de *H. pylori* de pacientes provenientes de la población de Túquerres, región de alto riesgo para el cáncer, se correlaciona negativamente a la incidencia a cáncer gástrico, en las poblaciones de Nariño. Evidenciándose variación geográfica en la resistencia a la claritromicina en *H. pylori*, en Colombia.

El efecto de las mutaciones en el fragmento del dominio V del 23S *rRNA* de *H. pylori*, fue mayor en la población de Túquerres donde 4/5 de los aislados resistentes presentaron mutaciones, ya que en solo 13/21 de los aislados de Tumaco presentaron mutaciones. Es claro que el efecto puede estar asociado al tamaño de muestra menor en la población de Túquerres.

Se observó que el 50% de los aislados susceptibles de la población de Tumaco (10/20) y de Túquerres (6/12), presentaron mutaciones. Lo cual indicaría que su presencia en aislados susceptibles es de igual porcentaje en ambas poblaciones.

Se requiere la caracterización de las mutaciones en el gen 23S *rRNA* en mayor número de poblaciones Colombianas, con el fin de conocer las mutaciones asociadas a la resistencia a claritromicina en *H. pylori*.

3.8 LITERATURA CITADA

ABADI A.T, TAGHVAEI T, GHASEMZADEH A, AND A, M. MOBAREZ. 2011. High Frequency of A2143G Mutation in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Isolates Recovered from Dyspeptic Patients in Iran Saudi. J Gastroenterol 17(6): 396-399.

ACS (American Cancer Society). 2012. <http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-what-is-stomach-cancer> acceso junio 20 del 2012

ÁLVAREZ A, MONCAYO J. I, SANTACRUZ J. J, CORREDOR L. F, REINOSA E, MARTÍNEZ J.W, AND L BELTRÁN. 2009. Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Rev. méd. Chile; 137(10): 1309-1314.

ALVAREZ A, MONCAYO J. I, SANTACCRUZ J. J, SANTACOLOMA M, CORREDOR L. F, AND REINOSA. 2009. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. Antimicrob Ag Chemother 53(9): 4022-4024.

BARILE K. A, SILVA A. L, XAVIER J. N, ASSUMPÇÃO M. B, AND T. C CORVELO. 2010. Characterization of 23S rRNA domain V mutations in gastric biopsy patients from the eastern Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105(3): 314-317

BLASER M.J, AND J.C ATHERTON. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J.Clin. Invest. 113 (3):321-333

BAYERDORFFER E, NEUBAUER A, RUDOLPH B, THIEDE C, LEHN N, EIDT S, AND M STOLTE. 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. Lancet 345 (8965):1591-1594.

BINH T.T, SHIOTA S, NGUYEN L.T, HO DD, HOANG H.H, TA L, TRINH DT, FUJIOKA T, AND Y YAMAOKA. 2013. The Incidence of Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam. J Clin Gastroenterol 47(3):233-238

BRAVO L.E, CORTES A, CARRASCAL E, JARAMILLO R, GARCIA L.S, BRAVO P.E, BADEL A, AND P.A BRAVO. 2003. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colombia Medica 34:124-131.

BRUCE M.G, AND H.I MAAROOS . 2008. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 13(Suppl 1):1-6.

CAĞDAŞ U, OTAĞ F, TEZCAN S, SEZGIN O, ASLAN G, AND G EMEKDAŞ. 2012. Detection of *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance in gastric biopsy specimens. Mikrobiyol Bul. 46(3):398-409.

CORREA P, AND M.B PIAZUELO. 2010. Cáncer gástrico: el enigma colombiano. Rev Col Gastroenterol; 25(4): 334-337

CORTEZ A. B, FIGUEROA M.M, L.E BRAVO, MANCILLA L, PAZOS A, BUSTAMANTE J.A, FERNANDEZ F.F, AND A.J MATTA. 2012. Informe aColciencias proyecto 1106-493-26237.

COVER T.L, AND M.J BLASER .2009. *Helicobacter pylori* in health and disease. Gastroenterology 136 (6):1863-1873.

CUADRADO-LAVÍN A, SALCINES-CAVIEDES R, CARRASCOSA M. F, MELLADO P, MONTEAGUDO I, LLORCA J, COBO M, CAMPOS E.C, AYESTARÁN B, FERNÁNDEZ-POUSA A, AND E. GONZÁLEZ-COLOMINAS.2012. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. J Antimicrob Chemother 67 (1): 170 -173.

DE FRANCESCO V, GIORGIO F, HASSAN C, MANES G, VANNELLA L, PANELLA C, IERARDI E, AND A ZULLO .2010. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. Journal Gastrointestinal Liver Dis 19(4):409-414.

EISIG J.N, SILVA F.M, BARBUTI R.C, NAVARRO-RODRIGUEZ T, MORAES-FILHO J.P, AND J PEDRAZZOLI. 2011 *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. Arq Gastroenterol. 48 (4):261-264.

FIGUEROA M, CORTÉS A, PAZOS A, AND L.E BRAVO.2012. Susceptibilidad in vitro de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenido a partir de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Biomédica; 32(1): 32-42.

FRANCAVILLA R, LIONETTI E, CASTELLANETA S, MARGIOTTA M, PISCITELLI D, LORENZO L, CAVALLO L, AND E IERARDI. 2010. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. J Pediatr. (2):228-232

GARRIDO L, AND H TOLEDO. 2007. Novel Genotypes in *Helicobacter pylori* Involving Domain V of the 23S rRNA Gene. Helicobacter 12 (5): 505-509.

GERRITS M.M, VAN VLIET A. H, KUIPERSE.J, AND J.G, KUSTERS. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect. Dis. 6 (11): 699-709.

GOH K L, AND P NAVARATNAM .2011. High *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole but zero or low resistance to clarithromycin, levofloxacin, and other antibiotics in Malaysia. Helicobacter. 16(3):241-245

GRAHAM D.Y, AND ASHIOTANI . 2008. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol 5(6): 321-331.

HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95–98.

HAO Q, LI Y, ZHANG Z-L, LIU Y, AND H GAO. 2004. Newmutation points in 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China .World J Gastroenterol 10(7):1075-1077.

HENAO R. S. C, QUIROGAA,MARTÍNEZ M. J,AND R. W, OTERO. 2009. Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. Rev Col Gastroenterol 24(2): 110-114.

HIRATA K, SUZUKI H, NISHIZAWA T, TSUGAWA H, MURAOKA H, SAITO Y, MATSUZAKI J, AND THIBI. 2010. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol Hepatol. 1:S75-S79. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06220.x.

HWANG T. J, KIM N, KIM H. B, LEE B. H, NAM R. H, PARK J. H, LEE M. K, PARK Y. S, LEE D. H, JUNG H.C, AND I.S, SONG.2010. Change in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea.J Clin Gastroenterol.44(8):536-543.

IARC (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 61: 1–241. PMID:7715068.

ISAZA C, HENAO J, ÁLVAREZ A, MONCAYO I, SANTACRUZ J, MEISEL E, SALAZAR F Y, AND D GIRALDO. 2007. Comparación de dos protocolos de erradicación de *Helicobacter pylori*. Revista médica de Risaralda 2(3): 1-8

KARGAR M, GHORBANI-DALINI S, DOOSTI A, AND NSOUOD. 2012.Real-time PCR for *Helicobacter pylori* quantification and detection of clarithromycin resistance in gastric tissue from patients with gastrointestinal disorders. Res Microbiol. Feb;163(2):109-113.

KEARNEY, D. J. 2003. *Helicobacter pylori* Infection. Current Treatment Options inInfectious Diseases 5:197-206., D. J. 2003. *Helicobacter pylori* Infection. Current Treatment Options inInfectious Diseases 5:197-206.

KARCZEWSKA E, WOJTAS-BONIOR I, SITO E, ZWOLIŃSKA-WCISŁO M, AND A BUDAK. 2011. Primary and secondary Clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to*Helicobacter pylori* in southern Poland. Pharmacol Rep. 63(3):799-807.

KIM S. J, KIM J. G, JUNG K, HONG Y. H, KIM J. H, JUNG H. R, KWON JH, YANG Y. H, KIM H. J, DO J. H, PARK J, YOO B.C, AND S.M PARK. 200. Antimicrobial resistance rate of *Helicobacter pylori* isolates and detection of mechanism of clarithromycin resistance. Korean J Med.61(5):470-478.

KIM J, M. 2007. Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. Hanyang medical reviews. 27 (3):80-95

KIM M.K, KIM J S, JUNG C. J, KIM N, KIM Y-J AND S, SONG. 2004. Distribution of Antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* Strains over a 16-Year Period in Patients from Seoul, South Korea. Antimicrobial agents and chemotherapy. 48(12): 4843-4847

KIM J.Y, KIM N.Y, KIM S.J, BAIK G.H, KIM G.H, KIM J.M, NAM R.H, KIM H.B, LEE D.H, JUNG H.C, AND I.S, SONG. 2011. Regional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. Korean J Gastroenterol. 57(4):221-229.

KIM J.Y, KIM N, PARK H.K, JO H.J, SHIN C.M, LEE S.H, PARK Y.S, HWANG J.H, KIM J.W, JEONG S.H, LEE D.H, NAM R.H, KIM J.M, LEE J.H, AND H.C JUNG. 2011. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and eradication rate according to gastroduodenal disease in Korea. Korean J Gastroenterol. 58(2):74-81.

MOMYNALIEV K. T, SELEZNEVA O. V, KOZLOVA A. A, VERESHCHAGIN V. A, IL'INA E. N, AND V. M. GOVORUN. 2005. A2144G Is the Main Mutation in the 23S rRNA Gene of *Helicobacter pylori* Associated with Clarithromycin Resistance. Russian Journal of Genetics 41 (10):1095-1100

MCCOLL, KENNETH E.L. 2010. *Helicobacter pylori* Infection. New England Journal of Medicine 362(17): 1597-1604

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D, HUNT R, ROKKAS T, VAKIL N, AND E. J KUIPERS. 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 56:772-781

MERA R, FONTHAM E. T. H, BRAVO L. E, BRAVO J. C, PIAZUELO M. B, CAMARGO M. C, AND P CORREA .2005. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. Gut. 54(11): 1536-1540

NADENSKOV-SORENSEN, BUKHOLM P. G, AND K BOVRE. 1990. Natural competence for genetic transformation of *Campylobacter pylori*. J. Infect. Dis. 161: 365-366

LIU Z, SHEN J, ZHANG L, SHEN L, LI Q, ZHANG B, ZHOU J, GU L, JUNLINGG.M, WEI-CHENG Y, AND D DENG. 2008. Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori* 23S rRNA in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiology 8:81 doi:10.1186/1471-2180-8-81

LIU G, XU X, HE L, DING Z, GU Y, ZHANG J, AND L ZHOU. 2011. Primary antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Isolated from Beijing Children. Helicobacter 16: 356-362. LIU Z, SHEN J, ZHANG L, SHEN L, LI Q, ZHANG B, ZHOU J, GU L, FENG G,

MA J, YOU WEI-CHENG, AND DDENG .2008.Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori*-23S *rRNA* in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiol. 8: 81. doi:10.1186/1471-2180-8-81

LEE J. W, KIM N, KIM J. M, NAM R. H, CHANG H, KIM J. Y, SHIN C. M, PARK Y. S, LEE D.H, AND H.C JUNG.2012. Prevalence of Primary and Secondary Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. Helicobacter. Dec 13. doi: 10.1111/hel.12031. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241101> visto el 23 de Enero del 2013.

OLEASTRO M, MÉNARD A, SANTOS A, LAMOULIATTE H, MONTEIRO L,BARTHÉLÉMY P,AND F MÉGRAUD.2003.Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in*Helicobacter pylori*.J Clin Microbiol41(1): 397-402.

PLAN DE ATENCION DE LA PRIMERA INFACIA ALCALDÍA DE TUMACO. 2008-2011. Consultado en internet 26-6-2013 http://www.colombiaaprende.edu.co/html/familia/1597/articles-305953_TUMACO.pdf

PERFIL EPIDEMIOLOGICO DE TUMACO. 2012. Consultado de internet 26-6-2013 <http://tumaco-narino.gov.co/apc-aa-files/3037636132613665303333064623836/perfil-epidemiologico-ao-2011-ultima-version.pdf>.

POSTERARO P, BRANCA G, SANGUINETTI M, RANNO S, CAMMAROTA G, RAHIMI S, DE CARLO M, POSTERARO B, AND G FADDA. 2006. Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturing HPLC assay. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57(1): 71-78

RETSEMA J, AND W FU. 2001. Macrolides: structures and microbial targets. International Journal of Antimicrobial Agents. 18(1): 3-10

RICCI C, HOLTON J,AND D VIARA. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. Best Practice y Research Clinical Gastroenterology 21 (2): 299-313

RIMBARA E, FISCHBACH L.A, AND D.Y, GRAHAM.2011. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. Nat Rev Gastroenterol Hepatol.8:79-88.

RIMBARA E, NOGUCHI N, KIJIMA H, YAMAGUCHI T, KAWAI T, AND M SASATSU. 2007. Mutations in the 23S *rRNA* gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Japan.International Journal of Antimicrobial 30 (3): 250-254

RHIE S.Y, KIM J. K, SEO Y.W, KIM K.S, PARK B.J, AND S. M PARK.2007. Antimicrobial Resistance Rate Of *Helicobacter Pylori* Strains Isolated From Korean Patients And Mechanism Of Clarithromycin Resistance. http://www.papersearch.net/view/detail.asp?detail_key=07809647

ROZEN S, AND H.J SKALETISKY .(2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386 Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

RUBIANO J. V, AND M. G VELAZQUEZ.2007.ATROFIA, METAPLASIA Y CÁNCER GÁSTRICO:¿DÓNDE ESTÁ LA EVIDENCIA?. Revista colombiana de cirugía 22 (1):39-46

SARACINO I. M, ZULLO A, HOLTON J, CASTELLI V, FIORINI G, ZACCARO C, RIDOLA L, RICCI C, GATTA L, AND D VAIRA. 2012. High prevalence of primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Italy. J Gastrointest Liver 21(4):363-365.

SCARPELLINI P, CARRERA P, CAVALLERO A, CERNUSCHI M, MEZZI G, TESTONI P, ZINGALE A, AND A LAZZARIN. 2002. Direct Detection of *Helicobacter pylori* Mutations Associated with Macrolide Resistance in Gastric Biopsy Material Taken from Human Immunodeficiency Virus-Infected Subjects. Journal of clinical microbiology 40 (6):2234-2237

SCHABEREITER-GURTNER C, HIRSCHL A M, DRAGOSICS B, HUFNAGL P, PUZ S, KOVÁCH Z , ROTTER M, AND A MAKRISTATHIS. 2004. Novel Real-Time PCR Assay for Detection of *Helicobacter pylori* Infection and Simultaneous Clarithromycin Susceptibility Testing of Stool and Biopsy Specimens J Clin Microbiol. 42(10): 4512-4518.

SECK A .O, BERG D. E, ANTONIO M, CORRAH T, TAPGUN M, WALTON R,THOMAS V, GALANO J. J, SANCHO J, ADEGBOLA R.A, AND J.E THOMAS.2012. Antimicrobial susceptibility and resistance patterns among *Helicobacter pylori* strains from The Gambia, West Africa. Antimicrob Agents Chemother <http://aac.asm.org/content/early/2012/12/18/AAC.00517-12.abstract>

SECK A, BURUCOA C, DIA D, MBENGUE M, ONAMBELE M, RAYMOND J, AND S BREUREC.2013. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013 Jan 8;12(1):3. Published online 2013 January 8. doi:10.1186/1476-0711-12-3

SHENJ, ZHANG J-Z, KE Y,AND D DENG.2005. Formation of A2143G Mutation of 23S *rRNA* in Progression of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* 26695. Microbial drug resistance 11(2):100-106

SHU-MEI S,TAO Z, ZHENG-HONG C, FEI W, XIAO-JUAN W, TING-NA Q,AND Y TING-XIU. 2012. Clarithromycin resistance and related gene mutation characteristics of *Helicobacter pylori* clinical isolates 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.11.012.

SERRANO A, CANDELARIA-HERNÁNDEZ M, SALAZAR, J DE LA GARZA, AND L. A HERRERA. 2009. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. Cancerología 4: 193-204

SUERBAUM S, AND P MICHETTI. 2002. *Helicobacter pylori* Infection. New England Journal of Medicine 347 (15):1175-1186.

SUGIYAMA T, SAKAKI N, KOZAWA H, SATO R, FUJIOKA T, SATOH K, SUGANO K, SEKINE H, TAKAGI A, AJIOKA Y, AND T TAKIZAW. 2012. Sensitivity of biopsy site in evaluating regression of gastric atrophy after *Helicobacter pylori* eradication treatment. Aliment Pharmacol Ther. Suppl 2:187-190.

TANKOVIC J, LAMARQUE D, LASCOLS C, SOUSSY C.J, AND J.C DELCHIER. 2001. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* has a major impact on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. Pathol Biol (Paris). 49(7):528-533.

TAYLOR D.E, GEZ, PURYCHD, LO T, AND K HIRATSUKA. 1997. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 41 (12): 2621-2628.

TSUDA M, KARITAM, AND T. NAKAZAWA. 1993. Genetic transformation in *Helicobacter pylori*. Microbiol. Immunol. 37:85-89.

TRESPALACIOS A. A, REGINO W. O, AND M. M REYES. 2010. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Rev Col Gastroenterol 25 (1) :31 -38

TORACCHIO S, ACETO G.M, MARIANI-COSTANTINI R, BATTISTA P, AND L MARZIO. 2004. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. Helicobacter 9(5):396-399.

UAE-CRES (Unidad administrativa especial comision nacional de regulación en salud). 2011. Efectividad, seguridad y análisis económico de roxitromicina, telitromicina, azitromicina y claritromicina en neumonía en niños. Consultado en internet 26-6-2016 <http://www.cres.gov.co/Portals/0/Roxitromicina,%20telitromicina,%20azitromicina%20y%20claritromicina%20en%20neumon%C3%ADa%20en%20ni%C3%B1os%20Informe.pdf>

VALLEJOS M. C, GARRIDO O. L, CÁCERES L. D, MADRID A. M, DEFILIPPI C, AND H.A TOLEDO. 2007. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. Rev. méd. Chile 135(3): 287-293.

VAKIL N, AND F MEGRAUD. 2007. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 133: 985-100.

VAN DOORN L.J, GLUPCZYNSKI Y, KUSTERS J.G, MEGRAUD F, MIDOLO P, MAGGI-SOLCA N, QUEIROZ D.M, NOUHAN N, STET E, AND W.G QUINT. 2001. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. Antimicrob Agents Chemother 45:1500-1504.

VERSALOVIC J, OSATO M. S, SPAKOVSKY K, DORE M. P, REDDY R, STONE G. G, SHORTRIDGE D, FLAMM R. K, TANAKA S. K, AND D.Y GRAHAM. 1997. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J. Antimicrob. Chemother 40 (2): 283-286.

WU W, YANG Y, AND G SUN. 2012. Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. Gastroenterol Res Pract. Published online 2012 July 5. doi: 10.1155/2012/723183.

YEPES C. A, RODRÍGUEZ V. A, RUIZ M. Á, AND B ARIZA. 2008. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. Acta Médica Colombiana 33 (1): 11-14.

**5. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN LOS DOMINIOS,
transglicosilasa Y *transpeptidasa* DEL GEN *pbp1A* EN AISLADOS DE
Helicobacter pylori RESISTENTES A AMOXICILINA DE PACIENTES
PROVENIENTES DE LAS POBLACIONES DE TUMACO Y TÚQUERRES
(NARIÑO-COLOMBIA)**

5.1 RESUMEN

La infección por *H. pylori* se asocia con el desarrollo de patologías gástricas entre las que se encuentran: la gastritis crónica, la úlcera gástrica, duodenal y adenocarcinoma. La erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica se considera un método de quimioprevención del desarrollo de cáncer gástrico. El esquema de erradicación de primera línea consiste en claritromicina, amoxicilina y un inhibidor de protones. La amoxicilina es un betalactámico que se une a las proteínas de unión a la penicilina (PBP) interfiriendo en la síntesis de peptidoglicano; en *H. pylori* las mutaciones en el gen *pbp1A*, se han asociado a la resistencia a este antibiótico. Se evaluó la susceptibilidad a amoxicilina en 147 aislados de *H. pylori* de Túquerres, se amplificó por PCR y secuenció los dominios *transglicosilasa* y *transpeptidasa* del gen *pbp1A* en aislados de Tumaco y Túquerres, y se evaluó la asociación entre las mutaciones, resistencia *in-vitro* e *in-vivo*, se evaluó el efecto de los cambios silenciosos mediante la prueba de anova, los cambios en las características de volumen, punto isoeléctrico y solubilidad se evaluaron mediante prueba *t* en los grupos sensibles y resistentes de ambas poblaciones. Se observó que el 5.4% (8/147) de aislados de Túquerres fueron resistentes a amoxicilina *in-vitro*. Las mutaciones se evaluaron en 71 aislados de *H. pylori*, de estos 38 fueron resistentes a amoxicilina (30 de Tumaco y 8 de Túquerres) y 33 susceptibles (11 de Tumaco y 22 de Túquerres). Se encontraron 11 cambios en el fragmento dominio *transglicosilasa*, donde el cambio A69V (1/34) se presentó en un aislado resistente a amoxicilina de Tumaco. En el fragmento dominio *transpeptidasa* se observaron 47 cambios; donde los cambios K619T, N608S, T511A, T556S, T586M, M497H, I552V, I563T, I547T y A611S se presentaron en aislados de *H. pylori* resistentes de Tumaco y las mutaciones T593S, S638T, L494F, X594G, X595G, X596S y V601A solo en aislados de Túquerres. No se observó asociación entre las mutaciones en el *pbp1A*, y la resistencia *in-*

vitro e *in-vivo*. Los cambios de uso de codones no presentaron cambios significativos en los aislados susceptibles y resistentes de *H.pylori* de las poblaciones de Tumaco y Túquerres; las características de solubilidad, punto isoeléctrico y volumen de los aminoácidos que sufrieron cambios, no presentaron diferencias significativas. Las asociaciones de las mutaciones *in-vitro* podría estar relacionada a la cercanía a los dominios SKN368-371, SNN433-435, KTG555-557.

Palabras claves: *pbp1A*, peptidoglucano, *H. pylori*, amoxicilina

5.2 INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* se asocia estrechamente con el desarrollo de numerosas patologías gástricas entre las que se encuentran la gastritis crónica, la úlcera gástrica, duodenal y adenocarcinoma (Dunn et al, 1997; Parkin, 2006; Rosenstock et al, 2003). Se estima que esta bacteria coloniza entre 20 al 50% de los adultos en países desarrollados; en la mayoría de los países en desarrollo la prevalencia de la infección se estima en más del 80%, en especial en personas de nivel socioeconómico bajo (Frenck y Clemens 2003; Barik, 2010)

El tratamiento de erradicación de la infección de la mucosa gástrica, se realiza mediante la combinación de un inhibidor de bomba de protones y/o un compuesto de bismuto y dos antibióticos de primera línea como la amoxicilina, la claritromicina, la tetraciclina y metronidazol (Gerrits et al, 2006; Malfertheiner et al, 2007; Suzuki et al, 2011). El fracaso del tratamiento de erradicación puede darse por dosis inadecuadas, falta de adherencia al tratamiento, presencia de bombas de eflujo y mutaciones en los genes diana de los antimicrobianos (Megraud, 2005; Hu et al, 2007; Kwon et al, 2003)

Uno de los antibióticos más ampliamente empleados en la terapia de erradicación es la amoxicilina, este derivado semi-sintético de la ampicilina, inhibe la biosíntesis de la pared celular; uniéndose a las proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Krishnamurthy, 1999; Godoy et al, 2007), en la membrana plasmática; la *pbp1A* posee actividad

transglicosilasa/transpeptidasa y su función consiste en el alargamiento de las hebras de peptidoglicano y la formación del entrecruzamiento entre los péptidos de peptidoglicano (Scheffers y Pinho, 2005) por lo que su inhibición interfiere con la síntesis de peptidoglicano y crecimiento celular (Walsh, 2003). Se ha observado que los cambios puntuales de aminoácidos en el dominio transpeptidasa se asocian a la resistencia a amoxicilina; las mutaciones descritas actualmente son: A369T (Rimbara et al, 2008) S414A (Gerrits et al, 2002), S402G, E406A, Q406A, S417T, (Gerrits et al, 2006), M515I, E506A, S517T, D535N, S543R, T556S, N562Y (Kwon et al, 2003; Rimbara et al, 2007; Matteo et al, 2008), L648G, A649L, A656P (Tseng et al, 2009), T593A(Okamoto et al, 2002), Y484C, T541I, P600T (Paul et al, 2001), T438M (Co y Schiller, 2006).

La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a amoxicilina presenta variación geográfica con valores de 2.2%, 65.6%, 11.6% y de 0.5% para América, África, Asia y Europa respectivamente (De Francesco et al, 2010; Wu et al, 2012). Si bien la información sobre la prevalencia de la resistencia en Colombia es limitada, presenta valores de 7% (6/84) en Bogotá (Yepes et al, 2008), 3.8% (3/79) en el eje cafetero (Trespacios et al, 2010) y del 20.5% (30/146) en Tumaco (Figuerola et al, 2012), en ninguno de estos estudios se evaluaron mutaciones en el *pbp1A* y su asociación a la resistencia a amoxicilina. Se desconocen las mutaciones en el gen *pbp1A* y su asociación con la resistencia a amoxicilina en aislados de *H. pylori* provenientes de poblaciones con contraste en el riesgo a cáncer gástrico como los son Tumaco y Túquerres, al igual que la posible asociación entre las mutaciones en este gen y el fracaso en la erradicación de *H. pylori*. Esta información es útil para el desarrollo u implementación de metodologías de detección rápida de la resistencia y aplicación de esquemas de erradicación; por lo cual, esta investigación pretende caracterizar las mutaciones presentes en el gen *pbp1A*, y su posible asociación con la resistencia a la amoxicilina *in-vitro/ in vivo*.

5.3 OBJETIVO

Caracterizar las mutaciones presentes en los dominios *transglicosilasa* y *transpeptidasa* del gen *pbp1A* y su asociación a la resistencia *in-vitro/in-vivo* a amoxicilina en aislados de *H.pylori* de pacientes provenientes de Tumaco y Túquerres.

5.4 METODOLOGÍA

La resistencia a la amoxicilina se evaluó mediante el método de dilución en agar a 147 aislado de *H. pylori* de Túquerres. Se emplearon 41 aislados de Tumaco (30 resistentes y 11 susceptibles) para la amplificación y posterior secuenciación del dominio *transglicosilasa* y *transpeptidasa* del gen *pbp1A*. Esta se realizó en los aislados resistentes de Túquerres, resultantes de la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana.

5.4.1 Amplificación de los dominios *transglicosilasa* y *transpeptidasa* del gen *pbp1A* en *H. pylori*.

La caracterización de las mutaciones asociadas a la resistencia a amoxicilina en *H. pylori* se realizó mediante la amplificación por PCR de los dominios *transglicosilasa* (*pbp1A-1*) y *transpeptidasa* (*pbp1A-2*). La reacción se realizó en un termociclador (Swift MiniProTM, Esco), adicionando los siguientes reactivos a un tubo de 0.2 mL: buffer de PCR 1X (Buffer green 5X Promega[®]), MgCl₂ 1 mM (Promega[®]), DMSO al 10%, dNTPs 0.288 mM (Promega[®]), 50 pmol/μL de cada cebador (*pbp1A-1* [R-GCCATTCTTATCGCTCAAGTT y F-TCTCGTGTGAGCACCATG] y *pbp1A-2* [R-TCAAACCCATGCTCATTGAA y F-AAGCGTTCTTCGCTATCGTC]), 0.5 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega[®]); y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 50 μL. El ciclo térmico de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C/2 min, seguida de 35 ciclos [95 °C/1 min, 54°C/1 min, 53°C/1 min para *pbp1A-1* (dominio *transglicosilasa*) y de 52°C/1 min *pbp1A-2* (dominio *transpeptidasa*) y 72 °C/1 min] y una extensión final a 72 °C/ 5 min. La electroforesis de los productos de PCR se realizó a 80 voltios por una hora en una cámara horizontal (spectroline bio-o-visión[®]). Los productos de amplificación fueron obtenidos por electroforesis a 80 voltios por 1h en una cámara horizontal (spectroline bio-o-visión[®]). Estos se visualizaron mediante fluorescencia en luz U.V. (260/280 nm) en un

transiluminador (spectroline bio-o-visión®) en gele de agarosa (sigma®) al 2% teñida con 1µL de bromuro de etidio (0.5µg/mL). Para determinar el tamaño de los amplificadores de todos los genes se empleó un marcador de peso de 100pb (Fermentas ®); el tamaño amplicon fue de 340 pb para *pbp1A-1* dominio *transglicosilasa* y de 490 en el caso de *pbp1A-2* dominio *transpeptidasa*. (fragmento esperado mediante el análisis in silico y respecto a la distancia de migración del marcador de pares de bases). Los cebadores se diseñaron empleando la secuencia para el gen *pbp1A* código GenBank: AE000511.1 en el software Primer3 V 0.4.0 (Rozeny Skaletsky, 2000)

5.4.2 Aislamiento y purificación de amplificadores

Se tomó 43µl de cada una de las muestras y se adicionó 9µl de EXOSAP-IT®, e incubó a 37°C/15 min, posteriormente se inactivó la enzima a 80°C/15 min. Los amplificadores purificados se almacenaron a -10°C.

5.4.3 Secuenciación e identificación de mutaciones

Los amplificadores purificados del gen *pbp1A* (*pbp1A-1* y *pbp1A-2*), se secuenciaron en ambos sentidos (sentido y antisentido) empleando el analizador genético (ABI 3130 Applied Biosystem®), y la metodología *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem®), conforme a las condiciones estandarizadas en el laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad de Valle. Se empleó el *software* Bioedit v 7.1.11®(Hall, 1999) en la edición, alineamiento y traducción de las secuencias. Los cambios en las secuencias se cotejaron mediante el alineamiento local, con la secuencia referencia para el gen *pbp1A* de la cepa de *H. pylori* 26695 código GenBank AE000511.1. (Tomb et al, 1997)

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Población

Para determinar la población de estudio de esta investigación, se evaluó la resistencia antibiótica a amoxicilina *in-vitro* mediante el método de dilución en agar a 147/149 aislados de *H. pylori* provenientes de pacientes de Túquerres. Se observó que a partir de 147 aislados de *H. pylori* evaluados, 139/147 (94.6%) fueron susceptibles y 8/147 (5.4%) presentaron resistencia *in-vitro* a amoxicilina. La distribución por género fue del 50% (4 para cada género) donde 2, 4 y 2 aislados se obtuvieron a partir de pacientes en los rangos etarios de 19-35, 36-47 y 48-65 años respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14. Características demográficas preservados de *H. pylori* de pacientes de Túquerres a los cuales se le evaluó la susceptibilidad *in-vitro* a Amoxicilina.

Amoxicilina	
Susceptible	139 (94.6)
Resistente	8 (5.4)
Total	147 (100.0)
Edad (años)	
19-35	2(20.0)
36-47	4(60.0)
48-68	2(20.0)
Sexo	
Masculino	4(50.0)
Femenino	4(50.0)

En la tabla 14, se observa el número de aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a amoxicilina *in-vitro*, adicionalmente presenta el rango etario y género de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron los aislados resistentes. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de cada característica.

La población que se empleó para amplificar y secuenciar los dominios transglicosilasa transpeptidasa gen *pbp1A* correspondió a un total de 70 aislados de *H. pylori* en línea de base para las poblaciones de Tumaco y Túquerres; de estos 30 correspondieron a aislados de Túquerres, de los cuales 8 fueron resistentes y 22 susceptibles *in-vitro* a la amoxicilina, y 40 aislados provenientes de Tumaco, de los cuales 11 fueron susceptibles y 30 resistentes *in-vitro* a la amoxicilina. Los aislados de *H. pylori* susceptibles de la población, se

seleccionaron a asar, a partir del total de los aislados susceptibles de la *línea de base*.

5.5.2 Amplificación y secuenciación de los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)*, del gen *pbp1A* de *H. pylori* de aislados de Tumaco

En la población de Tumaco se amplificaron por PCR los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)*, del gen *pbp1A* de *H. pylori* en 41 aislados, de los cuales 30 correspondieron a aislados resistentes y 11 a aislados susceptibles *in-vitro* a la amoxicilina. Se logró amplificar *pbp1A-1* en 24/41 (58.5%) aislados de *H. pylori*, de los cuales 9/24 (37.5) fueron susceptibles y 15/24 (62.5%) correspondieron a aislados resistentes *in-vitro* a amoxicilina. El fragmento *pbp1A-2* se amplificó en 29/41 (70.7%), de los cuales 10/30 (25%) correspondieron a aislados susceptibles y 19/30 (65.5%) a aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a la amoxicilina (Tabla 14).

Tabla 14. Rendimiento de la amplificación por PCR de los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)*, del gen *pbp1A* en *H. pylori* de aislados de Tumaco.

Aislados de <i>H. pylori</i>	<i>Pbp1A-1</i>	<i>Pbp1A-2</i>
Evaluados		
Susceptibles	11 (25)	11 (26.8)
Resistentes	30 (75)	30 (73.2)
Total	41 (100.00)	41(100.00)
Amplificados	(58.5)	(70.7)
Susceptibles	9 (37.5)	10 (34.5)
Resistentes	15 (62.5)	19 (65.5)
Total	24(100.0)	29 (100.00)

En la tabla 14, se observa el número de aislados de *H. pylori* en *línea de base* susceptibles y resistentes a amoxicilina *in-vitro* provenientes de pacientes de la población de Tumaco. Se denominó evaluados al total de los aislados de *H. pylori* a partir de los cuales se amplificaron los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)* del gen *pbp1A*, y amplificados, a los aislados de *H. pylori* en los que fue posible amplificar el fragmento. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la característica.

5.5.2.1 Análisis de mutaciones en las secuencias del dominio *pbp1A-1* en los aislados de *H. pylori* de Tumaco: en este dominio se encontró un total de 8 cambios de aminoácidos diferentes tras el análisis de 24 secuencias. Los cambios en los aminoácidos se presentaron a partir de 11 mutaciones en el ADN que codifica para la proteína, donde los cambios C206T y G334A/C336T se presentaron en los aislados resistentes a amoxicilina *in-vitro* con códigos 23 y 70 respectivamente. Se observó mayor frecuencia en los cambios de aminoácidos presentes en los aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a la amoxicilina (Tabla 15).

Tabla 15. Descripción de las mutaciones en ADN y frecuencia de cambio de aminoácidos en las secuencias de *pbp1A-1* en los aislados de *H. pylori* de Tumaco.

<i>H. pylori</i> 26695		Cambio				Tumaco			
Codón-i	AAi	ADN	Codón	AAf	Mutación	R	%	S	%
TTT	F	T373C/T375C	CTC	L	F125L	15	0,45	9	0,39
ATT	I	A235G	GTT	V	I79V	5	0,15	5	0,22
GGC	G	A132T	AGT	S	G44S	5	0,15	5	0,22
ATT	I	A103T	GTT	V	I35V			1	0,04
ACC	T	C89A/C90T	AAT	N	T30N	1	0,03	1	0,04
ATC	I	A301G	GTC	V	I101V	5	0,15	2	0,09
GCG	A	C206T	GTG	V	*A69V	1	0,03		
GGC	G	G334A/C336T	AGT	S	*G112S	1	0,03		
Total cambios						33	1	23	1

En la tabla 15, se observan los cambios en ADN y en aminoácidos, presentes en las secuencias del gen *pbp1A-1* de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco. Los cambios se evalúan en relación a la secuencia de la cepa de *H. pylori* 26695 susceptible a la amoxicilina, en parte inferior se denota *Codón-i* que corresponde a la tripleta que codifica por el aminoácido en la casilla AAi, seguidamente se observa el Cambio, que indica los cambios en el ADN de las secuencias de *H. pylori* de Tumaco; en este el Codón referencia a la tripleta resultante tras los cambios en las secuencia de ADN, y AAf señala el cambio de aminoácido. La mutación se indica el cambio de aminoácidos. Las letras S y R corresponden a aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a amoxicilina respectivamente, donde se denota la frecuencia del cambio y su porcentaje %.

Se observó cambios en aminoácidos en todas las secuencias de *pbp1A-1* en aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco. Donde se presentaron los cambios A69V y G112S

únicamente en aislados resistentes con códigos 70 y 23 respectivamente; estos crecieron a concentraciones de 1 y 2 µg/mL de amoxicilina *in-vitro* (Tabla 16).

Tabla 16. Descripción de los cambios en las secuencias del dominio *pbp1A-1* y la susceptibilidad a amoxicilina en los aislados de *H. pylori* de Tumaco.

n	Aislamiento de <i>H. pylori</i>	Mutaciones en el dominio <i>pbp1A-1</i>					CIM µg/mL
Resistentes							
1	71	F125L					1
2	25	F125L					2
3	29	F125L					4
4	36	F125L					1
5	46	F125L					4
6	77	F125L					2
7	4	F125L	I79V				1
8	24	F125L	I101V				4
9	11	F125L	I101V				1
10	21	F125L	I101V	I79V			2
11	27	F125L	G44S	I101V			1
12	49	F125L	G44S	T30N			1
13	68	F125L	G44S	I79V			1
14	70	F125L	*G112S	G44S	I79V		1
15	23	*A69V	F125L	G44S	I101V	I79V	2
Susceptibles							
1	S 117	F125L					LB
2	S 108	F125L	I79V				LB
3	S 113	F125L	I79V				LB
4	S 116	F125L	I35V				LB
5	S 115	F125L	G44S	I101V			LB
6	S 109	F125L	G44S	I79V			LB
7	S 110	F125L	G44S	T30N			LB
8	S 112	F125L	G44S	I79V			LB
9	S 114	F125L	G44S	I101V	I79V		LB

En la tabla 16, se observa la totalidad de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco a los cuales se les amplificó y secuenció el dominio *pbp1A-1*. Los aislados susceptibles se denotan con la letra S, y la CIM (concentración mínima inhibitoria), el valor de concentración de la amoxicilina en la cual se presentó crecimiento del aislado, en el caso de los aislados sensibles se observa las letras LB que corresponde a *Línea de Base* y la casilla *n* al número de aislados. Las *mutaciones en el dominio pbp1A-1* se observan en cada aislado. El * señala la mutaciones únicas en aislados resistentes.

5.5.2.1 Análisis de mutaciones en el dominio *pbp1A-2* en las secuencias de los aislados de *H. pylori* de Tumaco: en este dominio se encontró un total de 34 cambios de aminoácidos diferentes tras el análisis de 29 secuencias. Los cambios en los aminoácidos se presentaron a partir de 58 mutaciones en el ADN que codifica para la proteína, donde los cambios: _1780G/_1781G/C1782A, G1795C/G1797A, G1831A/C1832G/G1833C, A1654 G/T1656C, A1688C, A1856C, A1489C/G1491T, A1823G, A1531G, A1666T, C1757T/C1758G, G1866A/G1868A se presentaron solo en aislados resistentes. Se observó mayor frecuencia en los cambios de aminoácidos en los aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a la amoxicilina (Tabla 17).

Tabla 17. Descripción de las mutaciones en ADN y frecuencia de cambio de aminoácidos en las secuencias de *pbp1A-2* en los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco.

<i>H. pylori</i> 26695		cambio				Tumaco			
Codón-i	AAi	ADN	Codón	AAf	Mutación	R	%	S	%
		_1780G/_1781G/C1782A	GGA	G	*X594G	2	1,67		
GCG	A	G1795C/G1797A	CCA	P	*A599P	2	1,67		
GCG	A	G1795A/G1797A	ACA	T	A599T			1	1,54
GCG	A	G1831A/C1832G/G1833C	AGC	S	*A611S	1	0,83		
GAT	D	T1524A	GAA	E	D508E	6	5,00	3	4,62
GAT	D	G1522A	ATT	N	D508N	8	6,67	4	6,15
GAT	D	G1603A	AAT	N	D535N	7	5,83	3	4,62
GGC	G	G1772A/C1773A	GAC	E	G591E	3	2,50	1	1,54
GGC	G	G1783A	AGC	S	G595S			2	3,08
ATT	I	A1654G/T1656C	GTC	V	*I552V	1	0,83		
ATT	I	A1688C	ACT	T	*I563T	1	0,83		
ATT	I	A1687G/T1689G	GTG	V	I563V	1	0,83	1	1,54
AAA	K	A1856C	ACG	T	*K619T	1	0,83		
ATG	M	A1489C/G1491T	CAT	H	*M497H	1	0,83		
Atg	M	G1545t	ATT	I	M515I	5	4,17	4	6,15
AAC	N	A1510G/C1512T	GAT	D	N504D	7	5,83	4	6,15
AAC	N	A1684G/C1686T	GAT	D	N562D	2	1,67	2	3,08
AAC	N	A1823G	AGC	S	*N608S	2	1,67		
CGT	R	C1819T/T1821C	TGC		R607C			1	1,54

CGT	R	C1945A/G1946A/T1947A	AAA	K	R649K	8	6,67	4	6,15
AGC	S	A1627C/C1629T	CGT	R	S543R	4	3,33	3	4,62
AGC	S	A1765G	GGC	G	S589G	14	11,67	6	9,23
TCG	S	T1807C	CGG	P	S603P			1	1,54
ACC	T	A1531G	GCC	A	*T511A	2	1,67		
ACC	T	A1531G/C1532T/C1533T	GTT	V	T511V	6	5,00	4	6,15
ACC	T	A1666T	TCC	S	*T556S	1	0,83		
ACC	T	C1757T/C1758G	ATG	M	*T586M	1	0,83		
ACC	T	A1777G/C1779A	GCA	A	T593A	2	1,67	3	4,62
ACC	T	C1916G	AGC	S	T639S	9	7,50	6	9,23
GTG	V	G1525A/G1527C	ATC	I	V509I	7	5,83	4	6,15
GTG	V	T1595C	GCG	A	V532A	14	11,67	5	7,69
GTG	V	G1786A/G1788T	ATT	I	V596I			2	3,08
GTG	V	G1866A/G1868A	ATA	I	*V622I	1	0,83		
TAT	Y	T1810C	CAT	H	Y604H	1	0,83	1	1,54
Total						120	100	65	100

En la tabla 17, se observan los cambios en ADN y en aminoácidos, presentes en las secuencias del gen *pbp1A-2* de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco. Los cambios se evalúan en relación a la secuencia de la cepa de *H. pylori* 26695 susceptible a la amoxicilina, en parte inferior se denota *Codón-i* que corresponde a la tripleta que codifica por el aminoácido inicial AAi (cepa 26695), seguidamente se observa la Cambio que indica los cambios y de posición en las secuencias de ADN de *H. pylori* de Tumaco; en este el Codón referencia a la tripleta resultante tras los cambios en la secuencia de ADN y AAf señala el cambio de aminoácido. La casilla mutación se señala el cambio de aminoácidos y su posición en la proteína *pbp1A*. Las letras S y R corresponden a aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a amoxicilina respectivamente, donde se denota la frecuencia del cambio y su porcentaje %.

Se observó 34 cambios en aminoácidos en todas las secuencias de *pbp1A-2* en aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco. Donde los cambios X594G, A599P, A611S, I552V, I563T, K619T, M497H, N608S, T511A, T556S, T586M, V622I se presentaron únicamente en aislados resistentes. Los cambios X594G en los aislados 36 y 15, A599P en los aislados 83 y 4, M497H en el aislado 107, V622I en aislado 99 y A611S/I552V en el aislado 6, estos crecieron a concentraciones 1 µg/mL de amoxicilina; los aislados 68 y 168 presentaron las mutaciones I563T y T556S respectivamente y crecieron a 2 µg/mL de amoxicilina; el cambio T511A se presentó en los aislados en 42 y 64 que crecieron a 1 y 2 µg/mL de amoxicilina respectivamente. Las mutaciones K619T/T586M y N608S se presentaron en los aislados 71 y 29 los cuales crecieron en medios con 4 µg/mL *in-vitro* (Tabla 18).

Tabla 18. Descripción de los cambios de aminoácidos en las secuencias del dominio *pbp1A-2* en y las susceptibilidad a amoxicilina *in-vitro* de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco.

n	Código aislado de <i>H. pylori</i>	Mutaciones en el dominio <i>pbp1A-2</i>	CIM μg/mL
Resistentes			
1	197	S589G/ V532A	1
2	86	D508E/ M515I/ V532A	1
3	29	D508E/ D535N/ *N608S/ V532A	4
4	168	D535N/ R649K/ *T556S/ T639S	2
5	78	D508E/ D535N/ I563V/ N562D/ S543R	2
6	100	D508E/ M515I/ S589G/ T593A/ T639S	1
7	36	*X594G/ G591E/ S589G/ T639S/ V532A	1
8	99	D508E/ M515I/ S589G/ T639S/ V532A/ *V622I	1
9	6	*A611S/ D508E/ D535N/ *I552V/ S543R/ S589G/ Y604H	1
10	42	D535N/ G591E/ R649K/ S543R/ S589G/ *T511A/ T639S	1
11	69	D508E/*I563T/M515I/R649K/S589G/T639S/V532A	2
12	64	D535N/G591E/R649K/S543R/S589G/*T511A/T639S	2
13	15	*X594G/D508N/N504D/S589G/T511V/V509I/V532A	1
14	172	D508N/N504D/R649K/S589G/T511V/V509I/V532A	1
15	107	D508N/*M497H/N504D/R649K/S589G/T511V/V509I/V532A	1
16	83	*A599P/D508N/N504D/R649K/S589G/T511V/V509I/V532A	1
17	71	D508N/D535N/*K619T/M515I/N504D/N608S/*T586M/V509I	1
18	4	*A599P/D508N/N504D/R649K/S589G/T511V/T639S/V509I/V532A	1
19	11	D508N/N504D/N562D/S589G/T511V/T593A/T639S/V509I/V532A	1
Sensibles			
1	S 131	A599T/D535N/S543R	LB
2	S 125	D535N/M515I/S543R/Y604H	LB
3	S 129	D508E/M515I/T593A/V532A	LB
4	S 137	N562D/S589G/T511V/T593A/T639S	LB
5	S 124	D508E/M515I/R649K/S589G/T639S/V532A	LB
6	S 132	D508E/G595S/M515I/S589G/T593A/T639S/V532A	LB
7	S 130	D508N/D535N/G595S/I563V/N504D/N562D/S543R/V509I	LB
8	S 127	D508N/G591E/N504D/R649K/S589G/T511V/T639S/V509I/V532A	LB
9	S 128	D508N/N504D/R649K/S589G/T511V/T639S/V509I/V532A/V596I	LB
10	S 123	D508N/N504D/R607C/R649K/S589G/S603P/T511V/T639S/V509I/V596I	LB

En la tabla 18, se observa la totalidad de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco a los cuales se les amplificó y secuenció el dominio *pbp1A-2*. Los aislados susceptibles se denotan con la letra S, y la casilla CIM (concentración mínima inhibitoria), al valor de concentración de la amoxicilina en la cual se presentó crecimiento el aislado, en el caso se los aislados sensibles se observa las letras LB que corresponde a *Línea de Base* y *n* al

número de aislados. Las mutaciones en el dominio *pbp1A-2* muestra la posición y cambios que presentaron la secuencias de la proteína *pbp1A* de cada aislado. El * señala la mutaciones únicas en aislados resistentes.

5.5.3 Amplificación y secuenciación de los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)*, del gen *pbp1A* de *H. pylori* de aislados de Túquerres.

En la población de Túquerres se amplificaron por PCR los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)*, del gen *pbp1A* de *H. pylori* en 30 aislados, de los cuales 8 correspondieron a aislados resistentes y 22 a aislados susceptibles *in-vitro* a la amoxicilina. Se logró amplificar *pbp1A-1* en 29/30 (97.6%) aislados de *H. pylori*, de los cuales 21/29 (72.4%) fueron susceptibles y 8/29 (37.6%) correspondieron a aislados resistentes *in-vitro* a amoxicilina. El fragmento *pbp1A-2* se amplificó en 19/30 (63.3%), de los cuales 11/19(57.9%) correspondieron a aislados susceptibles y 8/19 (42.1%) a aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a la amoxicilina (Tabla 19).

Tabla 19. Rendimiento de la amplificación por PCR de los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)*, del gen *pbp1A* de *H. pylori* en aislados de Túquerres.

Aislados de <i>H. pylori</i>	<i>Pbp1A-1</i>	<i>Pbp1A-2</i>
Evaluados		
Susceptibles	22(73.3)	22 (73.3)
Resistentes	8 (26.7)	8 (26.7)
Total	30 (100.00)	30(100.00)
Amplificados	(96.7)	(63.3)
Susceptibles	21 (72.4)	11 (57.9)
Resistentes	8 (37.6)	8 (42.1)
Total	29(100.0)	19 (100.00)

En la tabla 19, se observa el número de aislados de *H. pylori* en línea de base susceptibles y resistentes a amoxicilina *in-vitro* provenientes de pacientes de la población de Tumaco. Se denominó evaluados al total de los aislados de *H. pylori* a partir de los cuales se amplificaron los dominios *transglicosilasa (pbp1A-1)* y *transpeptidasa (pbp1A-2)* del gen *pbp1A*, y amplificados, a los aislados de *H. pylori* en los que fue posible amplificar el fragmento. Los valores entre paréntesis corresponden a la proporción de la característica.

5.5.3.1 Análisis de mutaciones en las secuencias del dominio *pbp1A-1* en los aislados de *H. Pylori* de Túquerres: en este dominio se encontró un total de 7 cambios de aminoácidos diferentes tras el análisis de 8 secuencias. Los cambios en los aminoácidos se presentaron a partir de 11 mutaciones en el ADN que codifica para la proteína, no se observó ningún

cambio único para aislados de *H. pylori* resistentes a amoxicilina *in-vitro*. Se observó mayor frecuencia en los cambios de aminoácidos presentes en los aislados de *H. pylori* susceptibles a la amoxicilina (Tabla 20).

Tabla 20. Descripción de las mutaciones en ADN y frecuencia de cambio de aminoácidos en las secuencias de *pbp1A-1* en los aislados de *H. pylori* de Túquerres.

<i>H. pylori</i> 26695		Cambio				Túquerres			
Codón-i	AAi	ADN	Codón	AAf	Mutación	R	%	S	%
ATT	I	A70T/T71A	TAT	Y	I24Y			1	2,7
ATC	I	A301G	GTC	V	I101V			4	10,8
AAA	K	A320G	AGA	R	K107R			1	2,7
GTG	V	G253A/G255A	ATA	I	V85I			1	2,7
TTT	F	T373C/T375C	CTC	L	F125L	6	60	21	56,8
GGC	G	A132T	AGT	S	G44S			3	8,11
ATT	I	A235G	GTT	V	I79V	4	40	6	16,2
Total						10	100	37	100,0

En la tabla 20, se observan los cambios en ADN y en aminoácidos, presentes en las secuencias del gen *pbp1A-1* de los aislados de *H.pylori* de la población de Túquerres. Los cambios se evalúan en relación a la secuencia de la cepa de *H.pylori* 26695 susceptible a la amoxicilina, en parte inferior se denota *Codón-i* que corresponde a la triplete que codifica por el aminoácido en la casilla AAi; el *Cambio* se señala los cambios y su posición en la secuencia de ADN del gen *pbp1A* de *H. pylori* de Tumaco; el *Codón* referencia a la triplete resultante tras los cambios en la secuencia de ADN. AAf señala el cambio de aminoácido y su posición en la proteína en mutación. Las letras S y R corresponden a aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a amoxicilina respectivamente, donde se denota la frecuencia del cambio y su porcentaje %.

El análisis de los cambios de aminoácidos en las secuencias del dominio *pbp1A-1* en aislados de *H. pylori* de Túquerres, se observó mayor número de mutaciones en los aislados susceptibles a la claritromicina. En total solo 7/8 de los aislados resistentes presentaron mutaciones, ninguna de estas presentes únicamente en aislados resistentes (Tabla 21)

Tabla 21. Relación de los cambios en el dominio *pbp1A-1* y la susceptibilidad *in-vitro* a amoxicilina de aislados de *H. pylori* provenientes de Túquerres.

n	Aislamiento de <i>H. pylori</i>	Mutación en el dominio <i>pbp1A-1</i>	CIM	
			µg/mL	
Resistentes				
1	301	I79V		1
2	323	F125L		2
3	328	F125L		1
4	338	F125L		1
5	316	F125L	I79V	1
6	310	F125L	I79V	1
7	333	F125L	I79V	2
8	399	NM		4
Susceptibles				
				LB
1	S 64	F125L		LB
2	S 65	F125L		LB
3	S 66	F125L		LB
4	S 67	F125L		LB
5	S 69	F125L		LB
6	S 74	F125L		LB
7	S 75	F125L		LB
8	S 76	F125L		LB
9	S 78	F125L		LB
10	S 79	F125L		LB
11	S 85	F125L		LB
12	S 68	F125L	I101V	LB
13	S 70	F125L	I79V	LB
14	S 71	F125L	V85I	LB
15	S 72	F125L	I24Y	LB
16	S 73	F125L	I79V	LB
17	S 77	I79V	K107R	LB
18	S 82	F125L	I79V	LB
19	S 80	F125L	G44S	I101V
20	S 81	F125L	I101V	I79V
21	S 83	F125L	G44S	I79V

En la tabla 18, se observa la totalidad de los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco a los cuales se les amplificó y secuenció el dominio *pbp1A-2*. Los aislados susceptibles se denotan con la letra S, y la CIM (concentración mínima inhibitoria), corresponde al valor de concentración de la amoxicilina en la cual se presentó crecimiento del aislado, en el caso se los aislados sensibles se observa las letras LB que corresponde a *Línea de Base* y la casilla *n* al número de aislados. En la casilla mutaciones en el dominio *pbp1A-1* se observan los cambios que presentaron la secuencias de cada aislado, en esta NM describe la ausencia de mutaciones.

5.5.2.1 Análisis de mutaciones en las secuencias del dominio *pbp1A-2* en los aislados de *H. pylori* de Túquerres: en este dominio se encontró un total de 27 cambios de

aminoácidos diferentes tras el análisis de 19 secuencias. Los cambios en los aminoácidos se presentaron a partir de 58 mutaciones en el ADN que codifica para la proteína, donde los cambios fueron: A1627C/C1629T, G1913C/C1914A, A1777G/C1779A, A1777T/C1779A, C1916G, C1783G/-1785A y _1786A se presentaron solo en aislados resistentes generando los siguientes cambios de aminoácidos S543R, S638T, T593A, T593S, T639S, V601A, X595G y X596S respectivamente en la proteína *pbp1A*. Se observó mayor frecuencia en los cambios de aminoácidos en los aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a la amoxicilina (Tabla 22).

Tabla 22. Descripción de las mutaciones en ADN y frecuencia de cambio de aminoácidos en las secuencias de *pbp1A-2* en los aislados de *H. pylori* de Túquerres.

<i>H. pylori</i> 26695			cambio			Túquerres			
Codón-i	AAi	ADN	Codón	AAf	Mutación	R	%	S	%
GCG	A	G1795C/G1797A	CCA	P	A599P	1	2,5	1	2,1
GAT	D	T1524A	GAA	E	D508E	3	7,5	3	6,4
GAT	D	G1522A	ATT	N	D508N	8	20	1	2,1
GAT	D	G1603A	AAT	N	D535N	1	2,5	7	14,9
ATT	I	A1687G/T1689G	GTG	V	I563V	5	12,5	5	10,6
ATT	I	T1901C/T1902C	ACC	T	I634T			1	2,1
AAA	K	A1897G	GAA	E	K633E			1	2,1
CTG	L	C1588A/G1590T	ATT	I	L530I	4	10	2	4,3
Atg	M	G1545t	ATT	I	M515I	3	7,5	5	10,6
Atg	M	g1602A	ATA	I	M534I			1	2,1
AAC	N	A1510G/C1512T	GAT	D	N504D			1	2,1
CGT	R	C1945A/G1946A/T1947A	AAA	K	R649K			1	2,1
AGC	S	A1627C/C1629T	CGT	R	*S543R	1	2,5		
AGC	S	A1765G	GGC	G	S589G	1	2,5	5	10,6
AGC	S	G1913C/C1914A	ACA	T	*S638T	1	2,5		
ACC	T	A1531G/C1532T/C1533T	GTT	V	T511V			1	2,1
ACC	T	A1672T/C1674T	TCT	S	T558S	1	2,5	1	2,1
ACC	T	A1777G/C1779A	GCA	A	*T593A	1	2,5		
ACC	T	A1777T/C1779A	TCA	S	*T593S	1	2,5		
ACC	T	C1916G	AGC	S	*T639S	1	2,5		
GTG	V	G1525A/G1527C	ATC	I	V509I			1	2,1
GTG	V	T1595C	GCG	A	V532A			4	8,5
GTG	V	T1802C	GCG	A	*V601A	1	2,5		
ACC	T	_1779A/	ACA	T	X593T	2	5	3	6,4
GGC	G	_1782A	GGA	G	X594G	3	7,5	3	6,4
GGC	G	C1783G/-1785A	GGA	G	*X595G	1	2,5		

GTG	V	_1786A	AGT	S	*X596S	1	2,5
TOTAL						40	100 47 100

En la tabla 22, se observan los cambios en ADN y en aminoácidos, presentes en las secuencias del gen *pbp1A*-2 de los aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres. Los cambios se evalúan en relación a la secuencia de la cepa de *H. pylori* 26695 susceptible a la amoxicilina, en parte inferior se denota *Codón-i* que corresponde a la tripleta que codifica por el aminoácido en la casilla AAi; *Cambio* señala los cambios en la secuencia de ADN del gen *pbp1A* de *H. pylori* de Túquerres; AAf señala el cambio de aminoácido en la secuencia evaluada. Se designo mutaciones para indicar los cambios de aminoácidos y su posición en la proteína *pbp1A*. Las letras S y R corresponden a aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a amoxicilina respectivamente, donde se denota la frecuencia del cambio y su proporción %.

Se observó 27 cambios en aminoácidos en todas las secuencias de *pbp1A*-2 en aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres. Donde los cambios S543R, S638T, T593A, T593S, T639S, V601A, X595G y X596S se presentaron únicamente en aislados resistentes. Los cambios *T593S en el aislado con código 301, S543R/X595G/X596S en el aislado 316 y los cambios T639S/V601A en aislado 328, se observaron a concentraciones de 1 µg/mL de amoxicilina; y los cambios T593A y S638T presentes en los aislados 399 y 328, se observaron a concentraciones de 4 y 2 µg/mL de amoxicilina *in-vitro* respectivamente (Tabla 23).

Tabla 23. Relación de los cambios en el dominio *pbp1A-2* y la susceptibilidad *in-vitro* a amoxicilina de aislados de *H. pylori* provenientes de Túquerres.

n	Aislamiento de <i>H. pylori</i>				Mutación en el dominio <i>pbp1A-2</i>					CIM µg/ml	
L											
Resistentes											
1	333	D508E	D535N	M515I							2
2	399	D508E	D535N	M515I	*S638T						4
3	323	D508E	D535N	G595S	S589G	*T593A					2
4	301	D535N	I563V	L530I	M515I	*T593S					1
5	310	D535N	I563V	L530I	X593T	X594G					1
6	316	D535N	I563V	*S543R	X594G	*X595G	*X596S				1
7	328	A599T	D535N	I563V	L530I	*T639S	*V601A				1
8	338	D535N	I563V	L530I	T558S	X593T	X594G				1
Susceptibles											
1	S 86	D535N	M515I								LB
2	S 87	D535N	I563V	L530I							LB
3	S 95	D508E	D535N	V532A							LB
4	S 89	D535N	I563V	K633E	M515I	S589G					LB
5	S 93	D508E	I634T	M515I	S589G	V532A					LB
6	S 90	D535N	I563V	L530I	T558S	X593T	X594G				LB
7	S 91	D508E	D535N	M515I	S589G	V532A	X593T	X594G			LB
8	S 92	D535N	I563V	M515I	M534I	S589G	X593T	X594G			LB
9	S 88	A599P	D508N	I563V	N504D	R649K	S589G	T511V	V509I	V532A	LB

En la tabla 23, se observa la totalidad de los aislados de *H. pylori* de la población de Túquerres a los cuales se les amplificó y secuenció el dominio *pbp1A-2*. Los aislados susceptibles se denotan con la letra S, y la CIM (concentración mínima inhibitoria), corresponde a la concentración de la amoxicilina en la cual se presentó crecimiento del aislado, en el caso se los aislados sensibles se observa las letras LB que corresponde a *Línea de Base*.

Con la finalidad de establecer una posible asociación entre la resistencia *in-vitro* a amoxicilina y el fracaso del tratamiento en los pacientes; se emplearon las muestras resistentes *in-vitro* a amoxicilina (30 de Tumaco y 8 de Túquerres) y se compararon con las positivas para la prueba de aliento mediante [¹³C]-Urea. En total se empleo la información de 51 pacientes con la prueba de aliento positiva, de los cuales 25 fueron de Tumaco y 26 de Túquerres (Tabla 11), no se observó muestras positivas simultáneamente *in-vitro* e *in-vivo*.

Tabla 24. Relación de aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a amoxicilina y el fracaso de erradicación en pacientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

Tumaco										Túquerres											
n	Codigos de aislados resistentes					n	Codigos de pacientes con fracaso					n	Codigos de aislados resistentes			n	Codigos de pacientes con fracaso				
30	4	24	60	83	107	25	1	59	117	151	196	8	SV301	SV316	SV323	26	308	368	431	471	525
	6	29	64	86	155		35	66	126	159			SV333	SV338	SV399		313	377	436	480	526
	11	33	69	88	168		46	78	127	160			SV328	SV310			314	389	441	492	
	13	36	71	91	172		49	82	129	184							318	433	444	509	
	15	42	78	98	186		52	102	137	185							346	416	445	512	
	16	45	81	101	197		56	106	138	193							355	430	460	513	

En la tabla 11, se observan los códigos para los aislados resistentes a amoxicilina *in-vitro* y los códigos asignados a los pacientes con fracaso en la erradicación de *H. pylori*. En esta a resistentes, corresponde a los aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a claritromicina y en fracaso a los códigos de los pacientes positivos para la prueba de aliento [¹³C]-Urea. El esquema de erradicación, la terapia de erradicación y los datos de la prueba de aliento fueron tomados en el proyecto Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica.

Al evaluar en los grupos de aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles a la amoxicilina de ambas poblaciones; las diferencias en el punto isoeléctrico (pI) ocurridas por el cambio de los aminoácidos en el gen *pbp1A*, más no de su posición mediante una prueba de *t-student* pareada, no se presentaron diferencias significativas en el pI de los cambios presentes en los aislados de *H. pylori* resistentes (p= 0.08) y susceptibles a amoxicilina (p= 0.22). Al evaluar las diferencias de tamaño (volumen) en los cambios, no se presentaron diferencias significativas en los cambios presentados en los aislados de *H. pylori* susceptibles (p= 0.28) y resistentes (p= 0.38) amoxicilina, esta tendencia fue similar al evaluar la solubilidad de los cambios de aminoácidos en los aislados resistentes (p=0.32) y susceptibles (0.49), (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis de los cambios en el gen *pbp1A* en los aislados de *H. pylori* susceptibles y resistentes a amoxicilina

Característica	n	A.A original			A.A final			prueba T	IC	P
		Media	D.S	E.S	Media	D.S	E.S			
pI										
Susceptibles	28,00	6,04	1,91	0,36	6,43	1,71	0,32	-0.80	-1.41-0.62	0,22
resistentes	14,00	5,53	1,59	0,43	6,47	1,93	0,52	-1.47	-2.33-0.45	0,08
Tamaño										
Susceptibles	28,00	138,09	61,41	11,60	129,40	52,79	9,98	0.58	-22.07-39.43	0,28
resistentes	14,00	161,76	46,19	12,34	155,77	55,50	14,83	0.31	-36.13-48.10	0,38
Solubilidad										
Susceptibles	28,00	-0,60	2,93	0,55	-0,62	2,86	0,54	0.20	-1.12-1.15	0,49
resistentes	14,00	0,45	2,33	0,62	0,16	1,48	0,40	0.40	-1.10-1.60	0,32

En la tabla 25, se observa el valor de la prueba *t-student* pareada para las características de pI (punto isoeléctrico) y, Tamaño (volumen de los aminoácidos) y solubilidad en agua, que se presentaron en las secuencias del gen *pbp1A*, de aislados de *H. pylori* resistentes y susceptibles de las poblaciones de Tumaco y Túquerres. En esta *n* corresponde al número de cambios únicos en los aislados susceptibles y resistentes, Media al promedio de la característica, D.S a la desviación estándar, E.S al error estándar, prueba T al valor del análisis, IC a intervalo de confianza de la prueba y *p* a su significancia para una cola.

Se evaluó el efecto de los cambios silenciosos en el ADN (mutaciones que no alteran el aminoácido resultante), para lo cual se evaluaron 108 cambios en las secuencias de Tumaco y 68 en las secuencias de Túquerres, a las cuales se les evaluó el gen *pbp1A*. El efecto del cambio se evaluó comparando la frecuencia de uso del codón, entre los diferentes grupos, para lo cual se empleó una anova y un a prueba post *hoc de tukey*, que evaluó las diferencias en estos cambios entre los grupos de aislados de *H.pylori* susceptibles y resistentes a la amoxicilina provenientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, no se observaron diferencias significativas en los cambios de uso de los codones resultantes, entre los grupos ($p=0.962$), (Tabla 26 y 27).

Tabla 26. Análisis de variancia de la frecuencia de uso de los codones, en las secuencias de los aislados de *H. pylori* susceptibles y resistentes de Tumaco y Túquerres.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Inter-grupos	32,117	3	10,706	,096	,962
Intra-grupos	38661,323	347	111,416		
Total	38693,439	350			

En la tabla 26, se observa el valor de la anova F y su significancia *p*, al igual que los grados de libertad (gl).

Tabla 27. Prueba *post hoc* HSD de Tukey para el uso de los aminoácidos en los aislados de *H. pylori* susceptibles y resistentes a amoxicilina de las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

Poblaciones	N	Grupo
Tumaco		1
susceptible	108	16,875
resistente	108	17,026
Túquerres		
susceptible	68	17,137
resistente	68	17,727
Sig.		0,954

En la tabla 27, se observa el resultado de la prueba *post hoc* de Tukey, no se observó diferencias entre los grupos.

5.6 DISCUSIÓN

5.6.1 Prevalencia de la resistencia a amoxicilina

Los estudios orientados a evaluar la susceptibilidad de *H. pylori* a amoxicilina en Colombia son escasos; estos difieren, en la metodología de análisis de la susceptibilidad y en la prevalencia de la resistencia. En esta investigación la prevalencia de la resistencia a amoxicilina en los aislados de *H. pylori* provenientes de la población de Túquerres fue del 5.4% (8/147); valor muy similar a los reportados en estudios previos; en la ciudad de Bogotá, donde la proporción de la resistencia del 7% (6/84), mediante la técnica de difusión en disco (Yepes et al, 2008); y del 3.8% (3/79) mediante la técnica de *E-test* (Trespalcacios et al, 2010), y contrasta con lo reportado en aislados de *H. pylori* del eje cafetero (Armenia y Pereira), donde no se presentó resistencia a la Amoxicilina (Alvares et al, 2009), y la

prevalencia del 20.5% (30/146) reportada en Tumaco –Nariño (Figueroa et al, 2012). Estos registros muestran variación geográfica de la prevalencia en la resistencia a amoxicilina en Colombia, donde los contrastes en la prevalencia de la resistencia pudieran ser explicados por una mayor exposición al antimicrobiano (Kim et al, 2011; Lee et al, 2012).

La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a amoxicilina presenta variación geográfica, lo cual se observa en los valores de reportados de: 2.2%, 65.6%, 11.6% y de 0.5% para América, África, Asia y Europa respectivamente (De Francesco et al, 2010; Wu et al, 2012). Sin embargo la prevalencia de la resistencia a este antimicrobiano es bajo con reportes 0% en estudios llevados a cabo en Malasia (Goh et al, 2012), China, (Liu et al, 2013), Senegal (Seck et al, 2013) y Polonia (Karczewska et al, 2011), Vietnam (Binh et al, 2013), y Brasil (Eisig et al, 2011); del 1.4% (1/70) en España (Cuadrado et al, 2012) y de 37% (100/269) en Corea (Kim et al, 2011), respecto a los valores anteriores, lo encontrado en la población de Túquerres en Colombia, se encuentra dentro del promedio para el continente Americano (ver anexo 2).

Las diferencias observadas en la prevalencia de la resistencia a la amoxicilina entre las localidades de Tumaco (20.5%) y Túquerres (5.4%), puede tener explicación en las contraste socioeconómicos de las regiones; donde la región de Tumaco presenta altos niveles de pobreza, donde hasta el 70% de los individuos viven en condiciones de estrato 1, con fuentes de agua y alcantarillado mínimas (Perfil epidemiológico de Tumaco, 2012). Estas condiciones de salubridad han permitido que las infección bacterianas sean la principal causa de visita médica en la región, lo cual contrasta con lo observado en la población de Túquerres que a pesar de ser una región rural posee cobertura de agua potable y donde las afecciones medicas se asocian a enfermedades respiratorias. Si se considera que la amoxicilina se medica en caso de infecciones bacterianas en el aparato respiratorio, tracto gastrointestinal o genitourinario, enfermedades frecuentes en la localidad de Tumaco, la diferencia en la prevalencia en la resistencia estaría asociada a el tratamiento a estas enfermedades lo que explicaría la mayor prevalencia de la resistencia al antibiótico en Tumaco.

5.6.2 Mutaciones en el gen *pbp1A* y la resistencia amoxicilina

La resistencia a amoxicilina puede estar asociada a mutaciones en el gen *pbp1A*, por lo cual se pretendió caracterizar las mutaciones en este gen, que como lo indican estudios previos son responsables de la resistencia a β -Lactámicos como la amoxicilina en *H. pylori* (Gerrist et al, 2002; Rimbara et al, 2007; Qureshi et al 2011; Tseng et al, 2009)

Al modelar la estructura de la proteína *pbp1A*, se han descrito 6 motivos que serían las dianas de la amoxicilina. El primero es STGL (338-341), el segundo SAIL (368-371), el tercero SLA (402-404), el cuarto SLA (433-435), el quinto LTG (555-557) y el sexto SAA (559-561). Se sugiere que los cambios presentes en estos dominios pudieran interferir en la unión de antibiótico ya sea estereoquímicamente o por alteración en la hidrofobicidad del sitio (Figura 6).

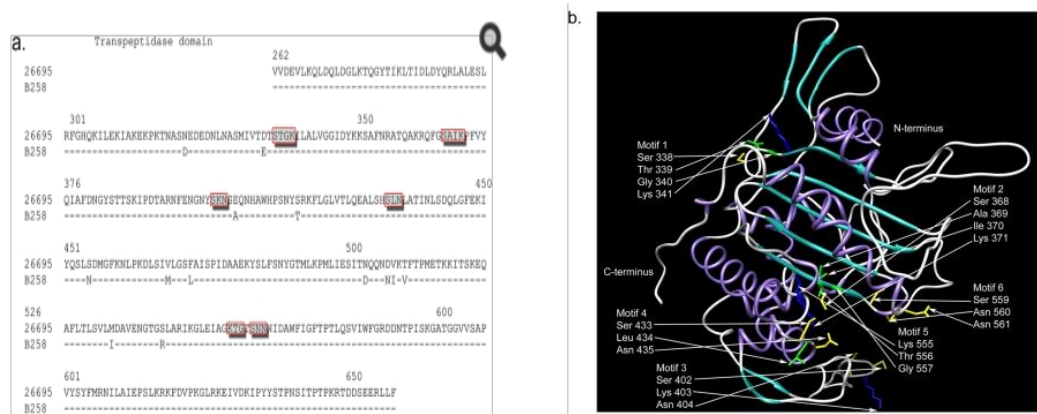


Figura 6. Descripción de los sitios diana para la amoxicilina en la proteína *pbp1A* (tomado de Qureshi et al, 2011)

En la figura 6, en el panel A se describe los cambios y su ubicación en la secuencia de de aminoácidos de la *pbp1A* en la cepa 26695, en el panel B se observa su localización en la estructura globular de la proteína *pbp1A*.

El cambio T556S se presentó el aislado de *H. pylori* con código 168 proveniente de la población de Tumaco, con una frecuencia de 1/19 y el presente un CIM = a 2 μ g/mL para la

amoxicilina, este cambio se ha asociado a la resistencia a este antibiótico siendo reportado en estudios previos (Won et al, 2003; Rimbara et al, 2007; Matteo et al, 2008), adicionalmente se presenta dentro del dominio quinto de la proteína, y a pesar de ser el cambio de dos aminoácidos apolares sin carga, puede dar origen al fenotipo resistente en *H.pylori*.

Se observa un posible efecto geográfico en las mutaciones T593A y S543R, este último se presentó en el aislado con código 10 de *H. pylori* de Túquerres que presentó una CIM = 2 µg/mL a amoxicilina y ha sido reportado como asociado a la resistencia a amoxicilina previamente (Okamoto et al, 2002). El cambio S543R se encuentra fuera de los dominios donde se considera que los cambios pueden generar fenotipos resistentes, sin embargo este cambio supone una alteración en la carga electrónica de la proteína ya que se cambia un aminoácido básico (S) por un polar con carga (R), sin embargo este efecto podría estar asociado a el menor número de aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* a amoxicilina provenientes de la población de Túquerres.

En esta investigación se encontraron cambios de aminoácidos básicos por polares sin carga (K619T, M497), aminoácidos polares sin carga por apolares (T511A, T586M) apolares por polares sin carga (I547T, I563T), cambios de aminoácidos ambos polares sin carga (N608S) o apolares (I552V) y de apolar por polar sin carga (A611S) estos cambios solo se presentaron en aislados resistentes de la población de Tumaco. Las características de polaridad y carga se presentaron de igual forma en aislados resistentes de la población, sin embargo solo los cambios I552V, I547T, I563T se presentan cerca de un dominio de interacción, en este caso el quinto LTG (555-557).

En la población de Túquerres los cambios fueron de inserciones X594G, X595G, X596S y cambios de aminoácidos polares sin carga (T593S y S638T), polares (L494F, y V601A), al igual que lo observado en Tumaco estos cambios de aminoácido se presentaron (en relación a la tipo de aminoácido) en aislados susceptibles, y no se encuentran próximos a ninguno de los motivos de interacción con la amoxicilina sugeridos. Las inserciones de aminoácidos

producen la deleción y pérdida del motivo 5 en todos los aislados. Adicionalmente estos cambios no se han descrito en la literatura por lo cual su rol en la resistencia no es claro.

Al evaluar las mutaciones en el fragmento denominado pbp1A-1, se observó que la mutación F125L, se encontraba en aislados resistentes de Tumaco (16/16 resistentes y 9/9 susceptibles) y Túquerres (7/8 resistentes y 20/21 susceptibles), por lo cual no estaría asociada a la resistencia a amoxicilina en este estudio, sin embargo esta mutación se encontró en la cepa de *H. pylori* 3778 resistente a concentraciones mayores de 256 mg/L de amoxicilina (Tseng et al, 2009).

La presencia de las mutaciones I24Y, K107R, V85I, I35V, F125L, G112S, G44S, I101V, I79V y T30N en aislados de *H. pylori* susceptibles a la amoxicilina provenientes pacientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, permiten concluir que estas mutaciones no se encuentran asociadas a la resistencia a este antibiótico. Adicionalmente los resultados sugieren que el cambio A69V (1/34) presente en un aislado resistente se asocia a la resistencia in-vitro a la amoxicilina, lo cual concuerda con lo observado en las cepas de *H.pylori* HPA116 y HPO1 resistentes a amoxicilina (Okamoto et al, 2002).

Si bien la asociación de estas mutaciones pudiera estar explicada por su presencia próxima a los sitios de actividad enzimática SKN368-371, SNN433-435, KTG555-557 de la proteína PBP localizados en la región C-terminal, donde las mutaciones provocan cambios conformacionales en las PBPs que disminuyen la afinidad de unión a la amoxicilina dando lugar a fenotipos resistentes (Qureshi et al, 2011; De Francesco et al, 2011) también pueden asociarse a la presencia de mutaciones como A296V, A494H, A541M, Q572G en gen *pbp2* (codificado por *ftsI*), A499V y Q536L en *pbp3* (codificado por *pbp2*) los cuales se encuentran fuera de las regiones evaluadas en este estudio (Rimbara et al, 2008).

Al parecer es determinante la posición del cambio en la secuencia de la proteína, ya que los análisis de propiedades físico químicas (volumen, punto isoeléctrico y solubilidad) no presentan diferencias significativas, por lo que estadísticamente no serían de efecto

significativo. De igual forma se podría pensar que el efecto de resistencia podría estar asociado a una mayor síntesis de la proteína mediada por cambios que si bien no afectarían la secuencia de esta proteína, si alterarían los codones y por ende incrementarían la cantidad de codones de uso frecuente a lo largo de la proteína, permitiéndole ser sintetizada rápidamente, sin embargo los análisis muestra que estos cambios silenciosos presentes en este estudio, no producen cambios significativos en las frecuencias de uso de los codones, como se esperaría en otros tipos de bacterias, se ha sugerido que esto no se presenta en *H.pylori* porque esta bacteria posee alta tasa de recombinación e integración de material genético de forma horizontal, un ejemplo sería la isla de patogenicidad CagPAI; esta integración de este material genético no permitiría la selección preferente de codones en particular (Lafay et al, 2000)

A pesar que las mutaciones en el gen *pbp1A* se asocian con la resistencia a amoxicilina en *H. pylori*, existen otros genes que pudieran ser responsables del fenotipo resistente, como la presencia mutaciones en el gen *hopC* y la delección en el gen *hopB* de *H. pylori* codificante por porinas, que al presentarse le permiten a la bacteria sobrevivir a concentraciones de 125 mg/L y 250 mg/L de amoxicilina respectivamente (Co y Schiller, 2006), adicionalmente si los cambios son simultáneos a mutaciones en el gen *pbp1A*, se observa crecimiento de la bacteria hasta concentraciones de 400 mg/L de amoxicilina, lo que sugiere un efecto aditivo (Matteo, 2008). Entre las características asociadas a la resistencia, se encuentra la presencia de betalactamasas; como lo describe una investigación en la cepa de *H. pylori* 3778 donde se encontró un producto idéntico a beta-lactamaseTEM-1 (GenBank accession: EU726527) que le permitía a esta cepa crecer en medios con concentraciones de amoxicilina mayores 256 mg/L (Tseng et al, 2009); la resistencia a la amoxicilina es poco probable que se dé por bombas de eflujo, debido a que este antibiótico presenta una hidrofobicidad muy baja, lo que es un requisito indispensable en fármacos que son sustrato de este tipo de estructuras (Kutschke y Jonge, 2005).

Esta investigación constituye el primer reporte sobre las mutaciones en el gen *pbp1A* en aislados de *H. pylori* provenientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres; en este se

encontraron mutaciones que no reportadas en investigaciones previas, sin embargo no se observó asociación entre la mutaciones y el fracaso en la erradicación de *H. pylori*. A pesar de estos resultados, se sugiere evaluar el efecto de las mutaciones en diseños de mutación dirigida o modelación con el fin de identificar su verdadero aporte a la resistencia a amoxicilina.

5.7 CONCLUSIONES

Solo se observó asociación en la resistencia a amoxicilina *in-vitro* en dos aislados de *H.pylori* que presentaron los cambio I69V y T556S provenientes de la población de Tumaco.

Las diferencias en número de aislados de *H. pylori* resistentes a amoxicilina provenientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, evaluados en este estudio no permitieron identificar el rol de las mutaciones de T593A y S543R, donde esta pareciera última pudiera estar asociada a la resistencia o ser un efecto de tamaño de la muestra.

La región *transpeptidasa* del *pbp1A*, presenta alta diversidad genotípica, pudiendo estar más relacionada con la resistencia a la amoxicilina, ya que en este se observó mayor número de cambios, al igual que un mayor número de mutaciones únicas en cepas de *H. pylori* resistentes a amoxicilina provenientes de Tumaco y Túquerres.

En las secuencias evaluadas del gen *pbp1A*, donde se presentaron mutaciones silenciosas estas no presentaron diferencias significativas en el cambio de codones, por otros de mayor uso por la *H. pylori*.

Los cambios de las propiedades de punto isoelectrico, volumen (tamaño del aminoácido), y solubilidad, producidos por los cambios de los aminoácidos, no son significativos cuando se presentan fuera de los sitios putativos de unión a la amoxicilina en *pbp1A*

5.8 LITERATURA CITADA

ÁLVAREZ A, MONCAYO J. I, SANTACRUZ J. J, CORREDOR L. F, REINOSA E, MARTÍNEZ J.W, AND L BELTRÁN .2009. Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Rev. méd. Chile; 137(10): 1309-1314.

BARIK A. S. 2009. *Helicobacter pylori* Infection in Developing Countries: The Burden for How Long?. Saudi J Gastroenterology15(3): 201–207.

BINH T.T, SHIOTA S, NGUYEN L.T, HO D.D, HOANG H.H, TA L, TRINH D.T, FUJIOKA T, AND Y YAMAOKA. 2013. The Incidence of Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam. J Clin Gastroenterology. 47(3):233-238

CO E. M, AND N. L SCHILLER. 2006. Resistance mechanisms in an in vitro selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother50: 4174-4176

CUADRADO-LAVÍN A, SALCINES-CAVIEDES R, CARRASCOSA M. F, MELLADO P, MONTEAGUDO I, LLORCA J, COBO M, CAMPOS E. C, AYESTARÁN B, FERNÁNDEZ-POUSA A, AND E GONZÁLEZ-COLOMINAS. 2012. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. J Antimicrob Chemother 67: 170 -173.

DE FRANCESCO V, GIORGIO F, HASSAN C, MANES G, VANNELLA L, PANELLA C, IERARDI E, AND A ZULLO. 2010. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. Journal Gastrointestinal Liver Dis 19(4): 409-414.

DE FRANCESCO V, ZULLO A, HASSAN C, GIORGIO F, ROSANIA R, AND E IERARDI. 2011. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol2(3): 35–41

DUNN B. E, COHENH, AND M. J. BLASER. 1997. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. 10: 720-741.

EISIG J. N, SILVA F. M, BARBUTI R C, NAVARRO-RODRIGUEZ T, MORAES-FILHO J. P, AND J PEDRAZZOLI. 2011. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. Arq Gastroenterology. 48 (4)261-264.

FRENCK R.W, AND J CLEMENS. 2003. *Helicobacter pylori* in the developing world. Microbes Infect. 5: 705-713.

GERRITS M. M, SCHUIJFFELD, VAN ZWETA. A, KUIPERSE. J, VANDENBROUCKE -GRAULS C. M, AND J. G KUSTERS. 2002. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter* . Antimicrob Agents Chemother46(7):2229-2233.

GERRITS, M. M, VAN VLIET A. M, KUIPERSE. J, AND J. G KUSTERS. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect. Dis.* 6 (11): 699-709.

GERRITS M.M, GODOY A. P, KUIPERSE.J, RIBEIROM. L, STOOFFJ, MENDONCAS, VAN VLIETA.H, PEDRAZZOLIJ. Jr, AND J.G KUSTERS. 2006. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 11(3): 181-187.

GODOY A.P, REIS F.C, FERRAZ L.F, et al.2007. Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 226-30.

GOH K.L,AND P NAVARATNAM.2011. High *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole but zero or low resistance to clarithromycin, levofloxacin, and other antibiotics in Malaysia. *Helicobacter*. 16(3): 241-245

HU C. T, WU C. C, LIN C. Y, CHENG C. C, SU S. C, TSENG Y. H, AND N.T LIN. 2007. Resistance rate to antibiotics of *Helicobacter pylori* isolates in eastern Taiwan. *J. Gastroenterology. Hepatol.* 22 (5):720-723.

KARCZEWSKA E, WOJTAS-BONIOR I, SITO E, ZWOLIŃSKA-WCISŁO M, AND A BUDAK. 2011 Primary and secondary Clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to *Helicobacter pylori* in southern Poland. *Pharmacol Rep.* 63(3):799-807.

KIM J.Y, KIM N.Y, KIM S.J, BAIK G.H, KIM G.H, KIM J.M, NAM R.H, KIM H.B, LEE D.H, JUNG H.C, AND I.S SONG. 2011. Regional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. *Korean J Gastroenterology.* 57(4):221-229.

KIM J. Y, KIM N, PARK H. K, JO H. J, SHIN C. M, LEE S. H, PARK Y. S, HWANG J. H, KIM J. W, JEONG S. H, LEE D. H, NAM R. H, KIM J. M, LEE J.H, AND H.C JUNG.2011. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and eradication rate according to gastroduodenal disease in Korea. *Korean J Gastroenterology.* 58(2):74-81.

KRISHNAMURTHY P, PARLOW M. H, SCHNEIDER J, BURROUGHS S, WICKLAND C, VAKIL N. B, DUNN B. E, AND S.H PHADNIS .1999. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 181: 5107-5110.

KUTSCHKE A, AND B.L DE JONGE. 2005. Compound efflux in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (7): 3009-3010

KWON D. H, DORE M. P, KIM J. J, KATO M, LEE M, WU J. Y, AND D.Y GRAHAM. 2003. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(7):2169-2178.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D, HUNT R, ROKKAS T, VAKIL N, AND E. J KUIPERS. 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56:772-781

MEGRAUD, F. 2005. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 53:1374-1384.

MATTEO M.J, GRANADOS G, OLMOS M, WONAGAA, AND M. CATALANO. 2008. *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 474-477.

NISHIZAWA T, SUZUKI H, TSUGAWA H, MURAOKA H, MATSUZAKI J, HIRATA K, IKEDA F, TAKAHASHI M, AND THIBI. 2011. Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(6):3012-3014.

LAFAY B, ATHERTON JC, AND PM SHARP. 2000. Absence of translationally selected synonymous codon usage bias in *Helicobacter pylori*. [*Microbiology*](#). 146 (Pt 4):851-60.

LEE J. W, KIM N, KIM J. M, NAM R. H, CHANG H, KIM J. Y, SHIN C. M, PARK Y. S, LEE D.H, AND H.C JUNG. 2012. Prevalence of Primary and Secondary Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. *Helicobacter*. 2012 Dec 13. doi: 10.1111/hel.12031. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241101> visto el 23 de Enero del 2013.

LIU G, XU X, HE L, DING Z, GU Y, ZHANG J, AND L ZHOU. 2012. Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Isolated from Beijing Children. *Helicobacter* 16: 356-362.

OKAMOTO T, YOSHIYAMA H, NAKAZAWA T, PARKI. D, CHANG M. W, YANAI H, OKITAK, AND M. SHIRAI. 2002. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (6): 849-856.

PAUL, R., S. POSTIUS, K. MELCHERS, AND K.P. SCHAFER. 2001. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *rdxA* and *pbp1* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3): 962-965.

PARKIN, D. M. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 118 (12):3030-3044

QURESHI N.N, MORIKIS D, AND N.L SCHILLER. 2011. Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(1):101-109.

RICCI C, HOLTON J, AND D VIARA. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Practice y Research Clinical Gastroenterology* 21 (2): 299-313

ROZEN S, AND H. J SKALETSKY. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386 Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

ROSENSTOCK S, JORGENSEN, BONNEVIEO, AND L ANDERSEN. 2003. Risk factors for peptic ulcer disease: A population based prospective cohort study comprising 2416 Danish adults. *Gut* 52 (2):186-193

RIMBARA E, NOGUCHI N, KAWAI T, AND M SASATSU. 2007. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology* 51(10): 939-944.

RIMBARA E, NOGUCHIN, KAWAIT, AND M SASATSU. 2008. Mutations in penicillin binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(5): 995-998.

SCHEFFERS D.J AND M.GPINHO. 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(4):585-607.

SECK A, BURUCOA C, DIA D, MBENGUE M, ONAMBELE M, RAYMOND J, AND S BREUREC. 2013. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013 Jan 8;12(1):3. doi: 10.1186/1476-0711-12-3.

SUZUKI H, T. NISHIZAWA, AND T. HIBI. 2010. *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol*. 5:639–648.

TOMB J. F, WHITE O, KERLAVAGE A. R, CLAYTON R. A, SUTTON G. G, FLEISCHMANN R. D, KETCHUM K. A, KLENK H. P, GILL S, DOUGHERTY B. A, NELSON K, QUACKENBUSH J, ZHOU L, KIRKNESS E. F, PETERSON S, LOFTUS B, RICHARDSON D, DODSON R, KHALAK H. G, GLODEK A, MCKENNEY K, FITZGERALD L. M, LEE N, ADAMS M. D, HICKEY E. K, BERG D. E, GOCAYNE J. D, UTTERBACK T. R, PETERSON J. D, KELLEY J. M, COTTON M. D, WEIDMAN J. M, FUJII C, BOWMAN C, WATTHEY L, WALLIN E, HAYES W. S, BORODOVSKY M, KARP P. D, SMITH H. O, FRASER C.M, AND J. C VENTER. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388(6642):539-47.

TSENG Y. S, WU D. C, CHANG C. Y, KUO C. H, YANG Y. C, JAN C. M, SU Y. C, KUO

F. C, AND L. L CHANG. 2009. Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Invest. 39(9):807-12.

TRESPALACIOS A. A, OTERO R. W AND R. M MERCADO. 2010. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Revista Colombiana de Gastroenterología 25(1): 31-38.

WALSH C. 2003. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, Washington, DC (p. 335).

WU W, YANG Y, AND G SUN. 2012. Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. Gastroenterology Res Pract. Published online 2012 July 5. doi: 10.1155/2012/723183.

YEPEZ C A, RODRÍGUEZ V. A, RUIZ M, AND B ARIZA. 2008. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignaciode Bogotá. Acta Médica Colombiana, 33,(1): 11-14.

6. DISCUSIÓN

La erradicación de *H. pylori* es el mejor tratamiento inicial de varias enfermedades gástricas graves (Suerbaum y Michetti 2002). Donde la resistencia de *H. pylori* a los principales antibióticos utilizados, se considera preponderante debido a su relación con el fracaso de la erradicación; sin embargo la información en Colombia es escasa destacándose las investigaciones realizadas por Izasa (2007), Yepes (2008), Henao (2009), Trespalacios (2010), y Figueroa (2012), donde se describen prevalencias de resistencia en un rango de 2.2% a 60% para claritromicina, y para amoxicilina entre 3.4% a 20.5%. En este estudio el caso particular de Túquerres la resistencia fue del 3.4% para claritromicina y del 5.4% para amoxicilina; valores que contrastan con los registros previos en Colombia y que señalan que la prevalencia de resistencia es relativa y dependiente del área geográfica (Castro et al, 2009; Ortiz et al, 2006; Di Mario, 2011). Respecto a la resistencia *in-vitro* y su impacto en el tratamiento, se debe considerar que según Megraud (2004), se recomienda la utilización de la terapia que incluye amoxicilina y claritromicina, cuando la prevalencia de la resistencia a este último es menor al 20%, esto con el fin de incrementar el éxito de erradicación, ya que en regiones donde la resistencia era menor al 10% se presentó una eficacia del tratamiento mayor al 90% (Chua et al, 2011). Este reporte indicaría que la terapia es óptima para la erradicación de *H. pylori* en la población de Túquerres, sin embargo se requiere de vigilancia ya que si la resistencia a la claritromicina registra proporciones mayores a 20% debe ser remplazada por otras opciones como la terapia cuádruple (Dore et al, 2000; Liu et al, 2008; Mégraud, 2012).

Diversos estudios realizados han descrito asociación entre las mutaciones puntuales en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* y la resistencia a la claritromicina y amoxicilina. En esta investigación se observó que las mutaciones en el gen *23S rRNA* incrementaban la posibilidad de un aislado de *H. pylori* de presentar un fenotipo resistente en condiciones *in-vitro*, la asociación con los valores de fracaso terapéutico para amoxicilina y claritromicina, no se realizó por el número limitado de aislados que se presentaron, con solo tres positivos para ambas evaluaciones y de los cuales solo dos presentaron mutaciones, sin embargo en estos resistentes se presentaron las mutaciones T2183C y C2196T lo cual asociaría estas

mutaciones al fracaso de erradicación en la población de Tumaco . El aislado positivo para ambas pruebas de la población de Túquerres no presento mutaciones, por lo cual se considero que en este caso el fracaso se presento por otras causa y no la mutación en este gen. Respecto al gen *pbp1A* ninguno de los aislados de *H. pylori* resistentes *in-vitro* presentaron fracaso de erradicación, por lo cual, la resistencia a este antibiótico no estaría asociado al fracaso de erradicación en este estudio. Estos resultados permiten concluir existe una baja por lo menos en esta investigación, asociación entre las mutaciones y la resistencia *in-vitro/vivo*, presentándose solo en aislados con mutaciones en el gen *23S rRNA* y tan solo en 3 aislados de Tumaco con lo cual podemos afirmar que son múltiples los factores asociados a la falla en la erradicación. Lo encontrado no podría ser similar por el bajo número de muestras a lo ha descrito en un estudio previo donde se evaluaron 2751 pacientes a quienes se les suministró la terapia triple en 11 ensayos multicentricos, en este se encontró, que el fracaso terapéutico en el 25,8% de los participantes, de los cuales el 94% de los individuos presentaron cepas *H.pylori* resistentes a claritromicina (Broutet et al, 2003); al igual que lo reportado en otro estudio, donde se observó una asociación entre el fracaso de erradicación de *H.pylori* y las mutaciones en el gen *23S rRNA*, en el cual se encontraron 20 aislados con la mutación A2142G (67%; $P < 0.001$), 12 aislados con el cambio A2143G (40%; $P < 0.001$) y 5 aislados (17%; $P = 0.003$) con la mutación A2142C (Yakoob et al, 2010). Pero concuerdan con los resultados de Garza-González (2007), que después de evaluar 112 pacientes, y encontrando solo 4 cepas de *H.pylori* resistentes a claritromicina, no encontró asociación entre la resistencia *in-vitro* a claritromicina, las mutaciones en el gen *23S rRNA* y el fracaso terapéutico, sin embargo en este estudio 2 muestras asociadas positivas *in-vitro/in-vivo* poseían las mutaciones T2183C y T2196C (grupos 10 y 13), lo cual podría asociar estas mutaciones a la resistencia a claritromicina, pero no explicaría la totalidad de los resultados. Adicionalmente los resultados observados en esta investigación podrían ser el resultado indirecto de los criterios de inclusión considerados en el proyecto macro en el cual se integraron pacientes que no hubieren recibido tratamiento previo con estos antibióticos; por lo cual no se encontrarían mutaciones descritas, ya que algunos autores sugieren que estas se presentan en *H. pylori* solo después de enfrentarse a un régimen de erradicación (Sheen et al, 2005; Kobayashi et

al, 2006.), y que la resistencia antimicrobiana en las poblaciones evaluadas estaría asociada a otras características como mutaciones por fuera del fragmento evaluado, o la presencia de bombas de eflujo en el caso de claritromicina (Hirata et al, 2010) o presencia de enzimas con función betalactamasa para amoxicilina (Tseng et al, 2009).

Se ha reportado la acción de sinergismo entre las mutaciones en el gen *23S rRNA* y la resistencia amoxicilina, donde se ha sugerido que los aislados de *H. pylori* que presentan la mutación A2143G, presentan resistencia a la amoxicilina (Sakinc et al, 2012), sin embargo esta mutación no se observó en ningunos aislados evaluados en este estudio. Sin embargo se observó que en este estudio todos los aislados a los cuales se les evaluó el gen *pbp1A*, presentaron cambios; algunos autores ha señalado que las mutaciones en este gen están asociadas con la pérdida de la permeabilidad a este antibiótico. Al poder identificar un posible efecto de sinergia entre la resistencia, en consideración que las estructuras de los antibióticos son diferentes donde la amoxicilina tiene un peso molecular de 365.4 g/mol y es de menor peso molecular que la claritromicina con 747.96 g/mol. Adicionalmente la amoxicilina posee un volumen menor que la claritromicina, se puede considerar que la reducción en la permeabilidad a la amoxicilina puede afectar la entrada de la claritromicina; esto se ha descrito en cepas resistentes y multiresistentes de *H.pylori* las cuales pierden la permeabilidad a los antibióticos (Gerrist et al, 2004), por lo cual se esperaría que la mutaciones de *pbp1A* involucrado en la síntesis de la pared celular se presentaran en aislados que no tuvieran mutaciones en *23S rRNA* y aun así fueran resistentes a los dos antimicrobianos, sin embargo en este estudio solo se describieron dos aislados de *H.pylori* con esa tendencia en la población de Tumaco y ninguno para la población de Túquerres, por lo cual un posible efecto de sinergia entre los cambios de los genes y la resistencia *in-vitro* a amoxicilina y claritromicina, no puede ser descrito (Tabla 26), lo cual indicaría que en la reducción de la permeabilidad a los antibióticos se estarían presentado otras estructuras como las porinas (Gerrist et al, 2004).

Tabla 28. Resumen de aislados resistentes de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina evaluados en la población de Tumaco y la presencia de mutaciones

		23S rRNA			Total
		M	S	NA	
Tumaco					
pbp1A	M	8	2	3	13
	S	0	0	0	0
	NA	1	2	3	6
Total		9	4	6	19
Túquerres					
pbp1A	M	2	0	6	8
	S	0	0	0	0
	NA	2	1	0	3
Total		4	1	6	11

En la tabla 28, se observan los aislados de *H. pylori* de la población de Tumaco, y que fueron resistentes a ambos antibióticos. En esta M corresponde a aislados con mutaciones, S sin mutaciones y NA no analizados.

Al evaluar la relación entre el fracaso de la erradicación medido por la prueba de aliento y la resistencia *in-vitro* se observó que la mayoría de los aislados con fracaso e erradicación, no fueron resistentes este fenómeno se ha asociado a la presencia de aislados de baja virulencia *cagA*- y *vacA* s2 se relacionaron con tasas bajas de erradicación (Domingo et al 2002). Lo cual concuerda con hallazgos previos en el departamento de Nariño donde las cepas aisladas de pacientes con fracaso terapéutico en su mayoría eran de baja virulencia sugiriendo un incremento significativo en la prevalencia de genotipos *cagA* negativo y *vacA* s2/m2, después del tratamiento anti-*Hp* (Fontham et al 2005). Sin embargo algunos trabajos reportan no encontrar relación entre las variables genotípicas de virulencia y susceptibilidad antibiótica de *H. pylori* (Francesco et al, 2006; Elviss et al, 2004; Zschausch et al, 2002; Godoy et al, 2003; Baglan et al, 2006), otros estudios si describen estas relaciones (Damaso et al, 1999; Chihu et al, 2005; Cellini et al, 2006; Alfaresi et al, 2007; Toro et al, 2003). Posiblemente, estas divergencias se deban a que la mucosa gástrica de un mismo paciente puede estar colonizada por múltiples cepas de *H. pylori* (virulentas y no virulentas) y de que coexistan aislados bacterianos susceptibles y resistentes a los antimicrobianos (Ende et

al, 2001). Estos fenómenos se han descrito como policolonización (Yakoob et al, 2001) o infección mixta (Wong et al, 2001).

Otro factor que pudiera explicar la presencia de aislados susceptibles en el fracaso de la erradicación es la recurrencia de la infección puede darse de dos maneras: 1) Recrudescencia, definida como la detección de una cepa similar a la aislada previamente a la erradicación. 2) Reinfeción, que corresponde a una nueva infección por una cepa distinta de *H. pylori* (Gómez et al. 2004). Entre los factores involucrados que se pueden asociar a este fenómeno se encuentra reservorio de la infección en el ámbito familiar, lo cual podría explicar los altos niveles de aislados susceptibles en el fracaso de la erradicación, ya que si bien un sujeto es tratado, es importante tener en cuenta que en el caso de las investigaciones previas en las cuales se enmarco esta investigación, los sujetos tratados estuvieron en un rango etario de 18-65, y sumado a que la prevalencia de estas localidades es cercana al 90%, los demás individuos de la familia, como infantes o menores de edad, contribuirían a la reinfeción del paciente tratado.

La poca información en Colombia sobre la prevalencia de la resistencia a antimicrobianos como la claritromicina y amoxicilina, empleados en la erradicación de la infección por *H.pylori*, no permiten evaluar el incremento o reducción en la resistencia, sin embargo un estudio realizado en China durante el periodo del 2003 al 2012, mostró incremento en la resistencia a amoxicilina de 6.3-14.9% (52/347), y de 17.2-23.7%(82/347) para claritromicina de (Lee et al, 2012), lo cual atribuyeron al empleo rutinario de estos antimicrobianos, sin cuidados regulatorios.

En conclusión los resultados de la investigación permiten rechaza la hipótesis de trabajo ya que, no se observaron diferencias en la frecuencia de las mutaciones entre las poblaciones, donde se esperaba mayor frecuencia de resistencia y frecuencia de mutaciones en los aislados de Túquerres, ya que esta población presenta mayor prevalencia en la incidencia de cáncer gástrico, y la persistencia de la infección por *H. pylori* facilitaría a progresión de la patología.

7. CONCLUSIONES

La mutaciones en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* de los aislados de *H.pylori* resistentes *in vitro* a amoxicilina, no permiten predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de erradicación de la infección por *H. pylori* aislados de pacientes provenientes de Tumaco y Túquerres.

La caracterización de las mutaciones en los genes *23S rRNA* y *pbp1A* de poblaciones con contraste de riesgo gástrico (Tumaco y Túquerres), mostró diferencias en la mutaciones, las cuales pueden ser por efecto del número limitado de muestras, algunas de las cuales no han sido reportadas previamente como indicadoras de resistencia antimicrobiana.

En el fracaso terapéutico, deben considerarse los fenómenos de reinfección que pueden presentarse en los pacientes, al igual que la medicación con fármacos antagónicos u otras como los inhibidores de las bombas de protones, que permitan la aparición de falsos positivos.

8. PERSPECTIVAS

Se requieren de estudios que evalúen en los aislados de *H.pylori* resistentes de pacientes provenientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, factores como bombas de eflujo o presencia de betalactamasas, y su rol en la resistencia *invivo* y *vitro* de estas poblaciones Colombianas.

Se requieren estudios con un número mayor de aislados en las diferentes regiones de Colombia con el fin de identificar mutaciones propias de las cepas circulantes en nuestro medio y su asociación no solo a la resistencia a amoxicilina y claritromicina, sino también a otros fármacos empleados en la erradicación.

Es necesario evaluar la susceptibilidad a antimicrobiana amoxicilina y claritromicina en *H.pylori*, con el fin de obtener registros de un número mayor de regiones, con la finalidad de establecer medidas de seguimiento a los esquemas de erradicación.

Se requiere caracterizar las características asociadas a fracaso de la erradicación más frecuentes en las poblaciones Colombianas, como la proporción de abandono del tratamiento, duración del tratamiento, las tasas de reinfección y la infección múltiple en el individuo.

9. LITERATURA CITADA

ABADI A.T, TAGHVAEI T, GHASEMZADEH A, AND A M. MOBAREZ. 2011. High Frequency of A2143G Mutation in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Isolates Recovered from Dyspeptic Patients in Iran Saudi J Gastroenterology 17(6): 396-399.

ACS (American Cancer Society) . 2012. <http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-what-is-stomach-cancer> acceso junio 20 del 2012

AHMED S, KHAN A AND AHMED I. 2006. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. Singapore Med. J 47(4): 291-296.

AMIEVA M.R, AND E.M EL-OMAR. 2008. Host bacterial interactions infection. Gastroenterology. 134: 306 – 23

ANDERSEN L. P, AND T WADSTRÖM. 2001. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Chapter 4 Basic Bacteriology and Culture <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2444/> acceso 21-06-2013

ALARCON T, DOMINGO D & M LOPEZ-BREA. 1999. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. International Journal of Antimicrobial Agents 12 (1999) 19–26

ALFARESI MS, ABDULSALAM AI, ELKOUSH AA. 2007. Analysis of *Helicobacter pylori* antimicrobial susceptibility and virulence genes in gastric mucosal biopsies in the United Arab Emirates. Indian J Gastroenterol 26(5): 221-224.

ÁLVAREZ A, MONCAYO J. I, SANTACRUZ J. J, CORREDOR L. F, REINOSA E, MARTÍNEZ J, W AND L BELTRÁN . 2009. Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Rev. méd. Chile; 137(10): 1309-1314.

ALVAREZ A, MONCAYO J.I, SANTACRUZ J.J, SANTACOLOMA M, CORREDOR L.F AND E REINOSA. 2009. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. Antimicrob Ag Chemother 53(9): 4022-4024.

ATHERTON, J. C., P. CAO, R. M. PEEK, JR., M. K. TUMMURU, M. J. BLASER, AND T. L. COVER. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 270: 17771-17777.

BAGLAN P, BOZDAYI G, OZKAN M, AHMED K, MITHAT A, AND A OZDEN. 2006.

Clarithromycin resistance prevalence and *iceA* gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. The Journal of Microbiology 2006;44(4):409-416

BARIK A. S. 2009. *Helicobacter pylori* Infection in Developing Countries: The Burden for How Long? Saudi J Gastroenterol. 15(3): 201–207.

BARILE K, SILVA A. L, XAVIER J. N, ASSUMPÇÃO M. B, AND T.C CORVELO. 2010. Characterization of 23S *rRNA* domain V mutations in gastric biopsy patients from the eastern Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105(3): 314-317

BAYERDORFFER E, NEUBAUER A, RUDOLPH B, THIEDE C, LEHN N, EIDT S, AND M STOLTE. 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. Lancet 345(8965):1591-1594

BAUERFEIND P, GARNER R, DUNN B.E, AND H. LMOBLEY. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. Gut; 40: 25-30.

BESWICK E, SUAREZ G AND V REYES. 2006. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. World J Gastroenterology 12: 5599-5605

BINH T. T, SHIOTA S, NGUYEN L. T, HO D. D, HOANG H. H, TA L, TRINH D. T, FUJIOKA T, AND Y YAMAOKA. 2012. The Incidence of Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam. J Clin Gastroenterology. J Clin Gastroenterology 47(3):233-8.

BLASER M.J AND J.C ATHERTON. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J.Clin. Invest. 113:321-33

BLONDEAU J. M, DECAROLISE, METZLERK. L, AND G. T HANSEN. 2002. Themacrolides. Expert Opin Investig Drugs 11:189-215

BRAVO L. E, CORTES A, CARRASCAL E, JARAMILLO R, GARCIA L. S, BRAVO P. E, BADEL A, AND P. A BRAVO. 2003. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colombia Medica 34:124-131.

BROUTET N, TCHAMGOUÉ S, PEREIRA E, LAMOULIATTE H, SALAMON R, AND F MÉGRAUD. 2003. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy--results of an individual data analysis of 2751 patients. Aliment Pharmacol Ther. 2003 17(1):99-109.

BRUCE M.G, AND H.I MAAROOS. 2008. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 13(Suppl 1):1-6.

CAĞDAŞ U, OTAĞ F, TEZCAN S, SEZGIN O, ASLAN G, AND G EMEKDAŞ. 2012. Detection of *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance in gastric biopsy specimens. Mikrobiyol Bul. 46(3): 398-409.

CALVO J, AND L MARTINEZ-MARTINEZ. 2009. Mecanismos de accion de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinic 27(1):44–52

CATALANO V, LABIANCA R, BERETTA G. D, GATTA G, DE BRAUD F, AND E VAN CUTSEM. 2005. Gastric cancer. Crit Rev Oncol Hematol 54:209-241.

CO E. M, AND N. L SCHILLER. 2006. Resistance mechanisms in an in vitro selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 50(12): 4174-4176

CAMARGO M. C, LAZCANO-PONCE E, TORRES J, VELASCO-MONDRAGON E, QUITERIO M, AND C PELAYO. 2004. Determinants of *Helicobacter pylori* seroprevalence in Mexican adolescents. Helicobacter 9(2): 106–114

CELLINI L, GRANDE R, DI CAMPLI E, DI BARTOLOMEO S, CAPODICASA S, MARZIO L. 2006. Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. Scand J Gastroenterol 41(3):280-287.

CHIHU L, AYALA G, MOHAR A, HERNANDEZ A, HERRERA GR, FIERROS G, GONZALEZ H, SILVA J. 2005. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican adults with clinical outcome. J Chemother 17(3):270-76

COVER T. L y M. J BLASER. 2009. *Helicobacter pylori* in health and disease. Gastroenterology 136(6):1863-1873.

COVER, T. L. AND S. R. BLANKE. 2005. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol 3:320-332

CORTEZ A. B, FIGUEROA M. M, L.E BRAVO, MANCILLA L, PAZOS A, BUSTAMANTE J. A, FERNANDEZ F. F AND A. J MATTA. 2012. Informe a Colciencias proyecto 1106-493-26237.

CORREA P, AND B.G SCHNEIDER. 2005. Etiology of gastric cancer: what is new? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14:1180-6.

CORREA P, FONTHAM T, BRAVO J, BRAVO L, RUIZ B, ZARAMA G, REALPE JL, MALCOM GT, LI D, JOHNSON WD, MERA R. 2000. Chemoprevention of gastric dysplasia: Randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. Journal of the National Cancer Institute 92 (23): 1881-1888

CORREA P, AND M.B PIAZUELO . 2010. Cáncer gástrico: el enigma colombiano. Rev Col Gastroenterol ; 25(4): 334-337

CORREA P.2011. Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. Revista. Colombiana de cirugía 26(2): 111-117.

CHEN B .A, ZHOU Y, YANG P, LIU L , QIN X.P AND X.T WUA. 2011. CDH1 _160C>A gene polymorphism is an ethnicity-dependent risk factor for gastric cancer. Cytokine 55: 266–273

CHUAH S.K, TSAY F. W, HSU P. I AND D. C WU. 2011. A new look at anti-*Helicobacter pylori* therapy World J Gastroenterology17(35): 3971-3975.

CUADRADO-LAVÍN A, SALCINES-CAVIEDES R, CARRASCOSA M. F, MELLADO P, MONTEAGUDO I, LLORCA J, COBO M, CAMPOS E. C, AYESTARÁN B, FERNÁNDEZ-POUSA A, AND E. GONZÁLEZ-COLOMINAS. 2012. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. J Antimicrob Chemother 67: 170 -173.

DAMASO D, ALARCON T, PRIETO N, LOPEZ M. 1999. Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. Rev Esp Quimioter12(4):340-45.

DE FRANCESCO V, MARGIOTTA M, ZULLO A, HASSAN C, TROIANI L, BURATTINI O, STELLA F, DI LEO A, RUSSO F, MARANGI S, MONNO R, STOPPINO V, MORINI S, PANELLA C, AND E IERARDI. 2006. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. Ann Intern Med. 144(2): 94-100

DE FRANCESCO V, GIORGIO F, HASSAN C, MANES G, VANNELLA L, PANELLA C, IERARDI E, AND A ZULLO .2010. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. Journal Gastrointestinal Liver Dis 19(4):409-414.

DE FRANCESCO V, ZULLO A, HASSAN C, GIORGIO F, ROSANIA R, AND E IERARDI. 2011. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol2(3): 35–41

D'ELIA L, ROSSI G, IPPOLITO R, CAPPUCCIO F. P, AND P STRAZZULLO. 2012. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: A meta-analysis of prospective Studies Clinical Nutrition. Clin Nutr. 31(4): 489-498.

DOMINGO D, ALARCON T, VEGA AE, GARCIA JA, MARTINEZ MJ, AND M LOPEZ . 2002. Microbiological factors that influence the eradications of *Helicobacter pylori* in adults and children. Enferm Infecc Microbiol Clin 20(9):431-34.

DOWSETT S. A, ARCHILAL, SEGRETOV. A, GONZALEZC. R, SILVA A, VASTOLAK. A, BARTIZEK R.D, AND M.J KOWOLIK. 1999. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: serostatus and oral and fingernail carriage. J. Clin. Microbiol. 37: 2456-2460

DORE M. P, LEANDRO G, REALDI G, SEPULVEDA A. R , AND D. Y GRAHAM. 2000. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. Dig Dis Sci 45:68-76.

DUNN, B. E, COHEN H, AND M. J. BLASER. 1997. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. 33 (10): 720-741.

EISIG J. N, SILVA F. M, BARBUTI R. C, NAVARRO-RODRIGUEZ T, MORAES-FILHO J. P, AND J PEDRAZZOLI. 2011. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. Arq Gastroenterology. 48 (4): 261-264.

ENDO H, YOSHIDA H, OHMI N, AND S. HIGUCHI. 2001. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of [14 C]amoxycillin into rat gastric tissue. J Antimicrob Chemother 47:405-410.

ENDE S, VAN DOORN LJ, ROOIJAKKERS S, FELLER M, TYTGAT G, DANKERT J. 2001. Clarithromycin susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. Journal of Clinical Microbiology 39(7): 2648-2651.

ELVISS NC, OWEN RJ, XERRY J, WALKER AM, AND K DAVIES. 2004. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. J Antimicrob Chemother 54(2):435-440.

ERAH P. O, GODDARDA. F., BARRETT D. A., SHAW P. N, AND R. C SPILLER. 1997. The stability of amoxycillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. J Antimicrob Chemother 39: 5-12.

EUCAST. 2000. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clinical Microbiology and Infection 6(9) : 509–515.

FIGUEROA M, CORTÉS A, PAZOS A, BRAVO LE. 2012. Susceptibilidad in vitro de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenido a partir de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Biomédica; 32(2): 32-42.

FERLAY J, SHIN H. R, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, AND D.M PARKIN. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.

Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

FONTANA C, FAVARO M, PIETROIUSTI A, PISTOIA E. S, GALANTE A, AND C. FA VALLI. 2003. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. J Clin Microbiol 41:3636-3640

FONTHAM TH, CORREA P, MERA R, BRAVO LE, BRAVO JC, PIAZUELO MB, AND C CAMARGO . Duration of exposure, a neglected factor in chemoprevention trials. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14(11):2465 - 6

FORMAN D, AND V. D, VURLEY. 2006. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. Best Practice y Research Clinical Gastroenterology 20 (4): 633-649

FRANCESCO V, MARGIOTTA A, ZULLO A, HASSAN C, AND D BURATTINI D. 2006. Claritromycin Resistance and *Helicobacter pylori* Genotypes in Italy. The Journal of Microbiology 44(6): 660-664.

FRENCK, R.W, AND J CLEMENS. 2003. *Helicobacter pylori* in the developing world. Microbes Infect. 5: 705-713.

FRANCAVILLA R, LIONETTI E, CASTELLANETA S, MARGIOTTA M, PISCITELLI D, LORENZO L, CAVALLO L, AND E IERARDI. 2010. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. J Pediatr. (2):228-232

GARRIDO L, AND H TOLEDO. 2007. Novel Genotypes in *Helicobacter pylori* Involving Domain V of the 23S rRNA Gene. Helicobacter ISSN 1523-5378

GUTIÉRREZ O, OTERO W, AND H CARDONA. 2003 Terapia cuádruple con furazolidona como tratamiento de rescate para la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Col. Gastroenterol 18: 222-228.

GARZA-GONZÁLEZ E, GIASI-GONZÁLEZ E, MATÍNEZ-VÁZQUEZ MA, PEREZ-PEREZ G. I, GONZALES G. M, MALDONADO- GARZA H.J, AND F. J BOSQUES-PADILLA. 2007. Erradicación de *H. pylori* y su relación con la resistencia a los antibióticos y el estatus de CYP2C19. Rev Esp Enferm Dig 99: 71-75.

GARZA-RAMOS G., XIONG L, ZHONG P, AND A MANKIN. 2001. Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. J Bacteriol 183(23):6898-6907.

GERRITS M. M, SCHUIJFFELD, VAN ZWETA. A, KUIPERSE. J, VANDENBROUCKE -GRAULS C. M, AND J. G KUSTERS. 2002. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter* . Antimicrob Agents Chemother 46(7):2229-2233.

GERRITS, M. M, VAN VLIET A. M, KUIPERSE. J, AND J. G KUSTERS. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect. Dis.* 6 (11): 699-709.

GERRITS M.M, GODOY A. P, KUIPERSE.J, RIBEIRO M. L, STOOFF, MENDONÇA, VAN VLIET A.H, PEDRAZZOLI J. Jr, AND J.G KUSTERS. 2006. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 11(3): 181-187.

GIRARDIN S.E, TRAVASSOS L. H, HERVÉ M, BLANOT D, BONECA I. G, PHILPOTT D. J, SANSONETTI P. J, AND D MENGIN-LECREULX. 2003. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem.* 278(43):41702-41708.

GISBERT J.P, AND J. M PAJARES. 2001. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol y a la claritromicina en España. Una revisión sistemática. *Medicina Clinica* 116(3):111-116

GODOY A, RIBEIRO M, AND Y BENVENGO. 2003 Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003;3:20.

GODOY A. P, REIS F. C, FERRAZ L. F, GERRITS M. M, MENDONÇA S, KUSTERS J. G, OTTOBONI L. M, RIBEIRO M.L, AND J. JR PEDRAZZOLI. 2007. Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 226-30.

GLOBOCAN (A). Incidencia del cáncer gástrico en el mundo para ambos sexos. 2008[En línea]<http://globocan.iarc.fr/map.asp?selection=24050ytitle=Stomachysex=0ytype=0ystaticic=2ymap=5ywindow=1ysize=1ycolor=1yscale=0ysubmit=%A0Execute%A0> citado 12 junio del 2012

GLOBOCAN (B). Incidencia y mortalidad para ambos sexos de los diferentes tipos de cánceres para Colombia en el año 2008. 2008[En línea].http://globocan.iarc.fr/bar_pop.asp?selection=41170ytitle=Colombiaysex=0ystaticic=0ywindow=1ygrid=1yinfo=1ycolor1=18ycolor1e=ycolor2=9ycolor2e=yorientation=1ysubmit=%A0Execute%A0 citado 12 junio del 2012

GOODMAN K.J AND P CORREA .1995. The transmisión of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* 24(5):875-87.

GOODMAN K. J, CORREA P, TENGANA H. J, DELANY J. P, AND T COLLAZOS. 1997. Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in Colombian children. *J Pediatr Gastroenterology Nutr* 25 (5):507-515

GOH K. L, AND P NAVARATNAM .2011. High *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole but zero or low resistance to clarithromycin, levofloxacin, and other antibiotics in Malaysia. *Helicobacter*. 16(3):241-245

GRAHAM D. Y, ALPERT L. C, SMITH J. L, AND H. H YOSHIMURA. 1988. Iatrogenic *Campylobacter-Pylori* infection is a cause of epidemic achlorhydria. *Am. J. Gastroenterology*. 83:974-980

GRAHAM D. Y, AND ASHIOTANI. 2008. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nature Clin Pract Gastroenterology Hepatol* 5: 321-331.

JIMÉNEZ F. P, AND M. P ESTÉVEZ. 1998. Cáncer gástrico: factores de riesgo. *Revista Cubana de Oncología* 14(3):171-179

JIMÉNEZ F, BARBAGLIA Y, BUCCI P, TEDESCHI F. A, AND F. E ZALAZAR. 2013. Molecular detection and genotypification of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies from symptomatic adult patients in Santa Fe, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 45(1):39-43.

GRAHAM DY, SHIOTANI A. 2008. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nature Clin Pract Gastroenterology Hepatol* 5: 321-31.

JAFRI N. S, HORNUNG C. A, AND C WHOWDEN. 2008. Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients naive to treatment. *Ann Intern Med* 148(12): 923-931.

HAO Q, LI Y, ZHANG Z-L, LIU Y, AND H GAO. 2004. Newmutation points in 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China .*World J Gastroenterology* 10(7):1075-1077.

HANSEN L. H, MAUVAISP, AND S. DOUTHWAITE. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA.*Mol Microbiol* 31:623-631

HENAO R. S. C, QUIROGA A, MARTÍNEZ M. J. D, AND R. W OTERO. 2009. Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* 24(2): 110-114.

HIRATA K, SUZUKI H, NISHIZAWA T, TSUGAWA H, MURAOKA H, SAITO Y, MATSUZAKI J, AND T HIBI. 2010. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterology Hepatol*. 1:S75-S79. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06220.x.

HWANG T. J, KIM N, KIM H. B, LEE B. H, NAM R. H, PARK J. H, LEE M. K, PARK Y. S, LEE D. H, JUNG H. C AND I.S SONG.2010. Change in antibiotic resistance of

Helicobacter pylori strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea. *J Clin Gastroenterol*. 44(8): 536-543.

HU C.T, WU C. C., LIN C. Y., CHENG C. C, SU S. C, TSENG Y. H, AND N.-T. LIN. 2007. Resistance rate to antibiotics of *Helicobacter pylori* isolates in eastern Taiwan. *J. Gastroenterology. Hepatol*. 22(5):720-723.

IARC (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 61: 1–241. PMID:7715068.

ISAZA C, HENAO J, ÁLVAREZ A, MONCAYO I, SANTACRUZ J, MEISEL E, SALAZAR F, AND D GIRALDO. 2007. Comparación de dos protocolos de erradicación de *Helicobacter pylori*. *Revista médica de Risaralda* 2(3): 1-8

KARGAR M, GHORBANI-DALINI S, DOOSTI A, AND N SOUOD. 2012. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* quantification and detection of clarithromycin resistance in gastric tissue from patients with gastrointestinal disorders. *Res Microbiol* 163(2):109-113.

KARCZEWSKA E, WOJTAS-BONIOR I, SITO E, ZWOLIŃSKA-WCISŁO M, AND A BUDAK. 2011. Primary and secondary Clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to *Helicobacter pylori* in southern Poland. *Pharmacol Rep*. 63(3):799-807.

KELLEY J.R, AND J.M. DUGGAN. 2003. COMMENTARY Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Clinical Epidemiology* 56: 1–9

KIM S. J, KIM J. G, JUNG K, HONG Y. H, KIM J. H, JUNG H. R, KWON J. H, YANG Y. H, KIM H. J, DO J. H, PARK J, YOO B. C, AND S.M PARK. Antimicrobial resistance rate of *Helicobacter pylori* isolates and detection of mechanism of clarithromycin resistance. *Korean J Med*. 61(5):470-478.

KIM J, M. 2007. Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *hanyang medical reviews* 27 (3):80-95

KIM M. K, KIM J. S, JUNG C. J, KIM N, KIM Y-J, AND S, SONG. 2004. Distribution of Antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* Strains over a 16-Year Period in Patients from Seoul, South Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(12): 4843-4847

KIM J.Y, KIM N.Y, KIM S.J, BAIK G.H, KIM G.H, KIM J.M, NAM R.H, KIM H.B, LEE D.H, JUNG H. C, AND I.S SONG. 2011. Regional difference of antibiotic resistance of *helicobacter pylori* strains in Korea. *Korean J Gastroenterology*. 57(4):221-229.

KIM J. Y, KIM N, PARK H. K, JO H. J, SHIN C. M, LEE S. H, PARK Y. S, HWANG J. H, KIM J. W, JEONG S. H, LEE D. H, NAM R. H, KIM J. M, LEE J.H, AND H.C JUNG.

2011. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and eradication rate according to gastroduodenal disease in Korea. Korean J Gastroenterology 58(2):74-81.

KRISHNAMURTHY P, PARLOW M. H, SCHNEIDER J, BURROUGHS S, WICKLAND C, VAKIL N. B, DUNN B. E, AND S.H PHADNIS .1999. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. J Bacteriolb 181: 5107-5110.

KWON D. H, DORE M. P, KIM J. J, KATO M, LEE M, WU J. Y, AND D.Y GRAHAM. 2003. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother.47(7):2169-2178.

KUTSCHKE A, AND B.L DE JONGE. 2005. Compound efflux in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother49 (7): 3009-3010

MA J, CHEN T, MANDELIN J, CEPONIS A, MILLER N. E, HUKKANEN M, MA G.F, AND Y.T KONTTINEN. 2003. Regulation of macrophage activation. Cell Mol Life Sci. 60(11):2334-46.

MALATY H.M. 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. Best Pract Res Clin Gastroenterology 21:205-14.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, 20'MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D, HUNT R, ROKKAS T, VAKIL N, AND E KUIPERS. 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 56(6): 772-781

MÉGRAUD F.1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Clin Gastroenterology.9: 507 – 18

MEGRAUD F. 2004. H. pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 53:1374-1384.

MÉGRAUD F, AND P LEHOURS. 2007. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical microbiology reviews 20(2): 280–322

MÉGRAUD F, AND R CORTI. 2009. Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. Acta Gastroenterol Latinoam 39: 282-290

Mégraud F. 2012. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. Therap Adv Gastroenterology. 5(2): 103–109.

MATTEO M.J, GRANADOS G, OLMOS M, WONAGAA, AND M. CATALANO. 2008. *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. J. Antimicrob. Chemother. 61: 474-477.

MERA R, FONTHAM E. T, BRAVO L. E, BRAVO J. C, PIAZUELO M. B, CAMARGO M. C, AND P CORREA. 2005. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. Gut. 54(11): 1536-1540

MINSALUD. Ministerio de salud y protección social de Colombia. Guía para manejo de urgencias tomo II. <http://www.minsalud.gov.co/Documentos y Publicaciones/Guía para manejo de urgencias tomo II.pdf> visitado 21 de junio del 2013

MOMYNALIEV K. T, SELEZNEVA O. V, KOZLOVA A. A, VERESHCHAGIN V. A, IL'INA E. N, AND V. M. GOVORUN. 2005. A2144G Is the Main Mutation in the 23S rRNA Gene of *Helicobacter pylori* Associated with Clarithromycin Resistance. Russian Journal of Genetics 41 (10):1095-1100

MCCOLL, AND E.L KENNETH. 2010. *Helicobacter pylori* Infection. New England Journal of Medicine 362(17): 1597-1604

MURRAY P. R, BARON E. J, AND M. A PFALLER. 2005. Manual of Clinical Microbiology, 6ed. Washington, DC: American Society for Microbiology.

MUELLER A, FALKOW S, AND M.R AMIEVA. 2005. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: what can be learned by studying the response of gastric epithelial cells to the infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.;14:1859-64.

NADENSKOV-SORENSEN P, BUKHOLM G. AND K BOVRE. 1990. Natural competence for genetic transformation of *Campylobacter pylori*. J. Infect. Dis. 161: 365-366

NISHIZAWA T, SUZUKI H, TSUGAWA H, MURAOKA H, MATSUZAKI J, HIRATA K, IKEDA F, TAKAHASHI M, AND T HIBI. 2011. Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. Antimicrob Agents Chemother. 55(6): 3012- 3016

NYSTRÖM J, AND A.M SVENNERHOLM. 2007. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. Vaccine. 25; 2591 – 2598

LAFAY B, ATHERTON JC, AND PM SHARP. 2000. Absence of translationally selected synonymous codon usage bias in *Helicobacter pylori*. [Microbiology](#). 146 (Pt 4):851-60.

LIU J-M, LIN J-T, LEE Y-C, WU C-Y, AND M-S WU. 2008. *Helicobacter pylori* infection in the elderly. International Journal of Gerontology 2(4):145-153

LIU Z, SHEN J, ZHANG L, SHEN L, LI Q, ZHANG B, ZHOU J, GU L, FENG G, MA J, YOU W.C, AND D DENG. 2008. Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori*-23S rRNA in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiology 8:81 doi:10.1186/1471-2180-8-81

LIU G, XU X, HE L, DING Z, GU Y, ZHANG J, AND L ZHOU. 2012. Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Isolated from Beijing Children. *Helicobacter* 16: 356-362.

LEE J. W, KIM N, KIM J. M, NAM R. H, CHANG H, KIM J. Y, SHIN C. M, PARK Y. S, LEE D.H, AND H.C JUNG. 2012. Prevalence of Primary and Secondary Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. *Helicobacter* 18(3):206-214

OKAMOTO T, YOSHIYAMA H, NAKAZAWA T, PARKI. D, CHANG M. W, YANAI H, OKITAK, AND M. SHIRAI. 2002. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (6): 849-856.

OLEASTRO M, MÉNARD A, SANTOS A, LAMOULIATTE H, MONTEIRO L, BARTHÉLÉMY P, AND F MÉGRAUD. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 41(1): 397-402.

OTERO R. W, GÓMEZ M. A, AND D CASTRO. 2009. Carcinogénesis gástrica. *Rev Col Gastroenterology* 24(3): 314-329.

PAUL R, POSTIUS, MELCHERSK, AND K.P SCHAFER. 2001. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *rdxA* and *pbpI* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 962-965.

PARKIN D. M, BRAY F. I, AND S.S DEVESEA. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37 8:S4-66.

PARKIN D. M. 2006. The global health burden of infection -associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 118: 3030-3044

POSTERARO P, BRANCA G, SANGUINETTI M, RANNO S, CAMMAROTA G, RAHIMI S, DE CARLO M, POSTERARO B, AND G FADDA. 2006. Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturing HPLC assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57(1): 71-78

QURESHI N.N, MORIKIS D, AND N.L SCHILLER. 2011. Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(1):101-109.

RETSEMA J, AND W FU. 2001. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 18(1): 3-10

RICCI C, HOLTON J, AND D VIARA. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. Best Practice y Research Clinical Gastroenterology 21 (2): 299-313

RHIE S.Y, KIM J. K, SEO Y.W, KIM K.S, PARK B.J, AND S. M PARK.2007. Antimicrobial Resistance Rate Of *Helicobacter Pylori* Strains Isolated From Korean Patients And Mechanism Of Clarithromycin Resistance. http://www.papersearch.net/view/detail.asp?detail_key=07809647

RIMBARA E, NOGUCHI N, KIJIMA H, YAMAGUCHI T, KAWAI T, AND M SASATSU. 2007. Mutations in the 23S *rRNA* gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Japan. International Journal of Antimicrobial 30 (3): 250-254

RIMBARA E, NOGUCHI N, KAWAI T, AND M SASATSU. 2007. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* . Microbiology and Immunology 51: 939-944.

RIMBARA E, NOGUCHI N, KAWAI T, AND M. SASATSU. 2008. Mutations in penicillin binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* . Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61: 995-998.

RIMBARA E, FISCHBACH L. A, AND D.Y GRAHAM.2011. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. Nat Rev Gastroenterology Hepatol 8:79-88.

ROZEN S, AND H J. SKALETISKY. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386 Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

ROSENSTOCK S, JORGENSENT, BONNEVIEO, AND L. ANDERSEN. 2003. Risk factors for peptic ulcer disease: A population based prospective cohort study comprising 2416 Danish adults. Gut 52: 186-193

RUBIANO J. V, AND M. G VELAZQUEZ. 2007. Atrofia, metaplasia y cáncer gástrico:¿dónde está la evidencia?. Revista colombiana de cirugía 22 (1):39-46

SARACINO I. M, ZULLO A, HOLTON J, CASTELLI V, FIORINI G, ZACCARO C, RIDOLA L, RICCI C, GATTA L, AND D VAIRA. 2012. High prevalence of primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Italy. J Gastrointest Liver 21(4):363-365.

SAKINC T, BAARS B, WÜPPENHORST N, KIST M, HUEBNER J, AND W OPFERKUCH. 2012. Influence of a 23S ribosomal RNA mutation in *Helicobacter pylori* strains on the

in vitrosynergistic effect of clarithromycin and amoxicillin. [BMC Res Notes](#). doi: 10.1186/1756-0500-5-603.

SCHEFFERS D.J AND M.GPINHO. 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(4):585-607.

SCARPELLINI P, CARRERA P, CAVALLERO A, CERNUSCHI M, MEZZI G, TESTONI P, ZINGALE A, AND LAZZARIN A. 2002. Direct Detection of *Helicobacter pylori* Mutations Associated with Macrolide Resistance in Gastric Biopsy Material Taken from Human Immunodeficiency Virus-Infected Subjects. *Journal of clinical microbiology*; Vol 40 No.6 pp. 2234-2237

SCHABEREITER-GURTNER C, HIRSCHL A M, DRAGOSICS B, HUFNAGL P, PUZ S, KOVÁCH Z , ROTTER M, AND A MAKRISTATHIS. 2004. Novel Real-Time PCR Assay for Detection of *Helicobacter pylori* Infection and Simultaneous Clarithromycin Susceptibility Testing of Stool and Biopsy Specimens *J Clin Microbiol*. 42(10): 4512-4518.

SECKA O, BERG D. E, ANTONIO M, CORRAH T, TAPGUN M, WALTON R, THOMAS V, GALANO J. J, SANCHEZ J, ADEGBOLA R.A, AND J. E THOMAS .2012. Antimicrobial susceptibility and resistance patterns among *Helicobacter pylori* strains from The Gambia, West Africa. *Antimicrob Agents Chemother* <http://aac.asm.org/content/early/2012/12/18/AAC.00517-12.abstract>

SECK A, BURUCOA C, DIA D, MBENGUE M, ONAMBELE M, RAYMOND J, AND S BREUREC.2013. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013 Jan 8;12(1):3. doi: 10.1186/1476-0711-12-3.

SERRANO A, CANDELARIA-HERNÁNDEZ M, SALAZAR, J DE LA GARZA, AND L. A HERRERA. 2009. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología* 4: 193-204

SHEN J, ZHANG J-Z, KE Y, AND D DENG. 2005. Formation of A2143G Mutation of 23S *rRNA* in Progression of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* 26695. *Microbial drug resistance* 11(2):100-106

SHU-MEI S, TAO Z, ZHENG-HONG C, FEI W, XIAO-JUAN W, TING-NA Q, AND Y TING-XIU. 2012. Clarithromycin resistance and related gene mutation characteristics of *Helicobacter pylori* clinical isolates 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.11.012.

STEMMERMANN G. N, AND C FENOGLIO-PREISER. 2002. Gastric carcinoma distal to the cardia: a review of the epidemiological pathology of the precursors to a preventable cancer. *Pathology* 34:494-503.

STONE M, A, PATEL H, PANJA K. K, BARNETT D. B, AND J. F MAYBERRY. 1998. Results of *Helicobacter pylori* screening and eradication in a multi-ethnic community in central England. Eur J. Gastroenterology. Hepatol10: 957-962

SUERBAUM S, AND P MICHETTI.2002. *Helicobacter pylori* Infection.New England Journal of Medicine 347(15):1175-1186.

SUGIYAMA T, SAKAKI N, KOZAWA H, SATO R, FUJIOKA T, SATOH K, SUGANO K, SEKINE H, TAKAGI A, AJIOKA Y, AND T TAKIZAW. 2012. Sensitivity of biopsy site in evaluating regression of gastric atrophy after *Helicobacter pylori* eradication treatment.Aliment Pharmacol Ther. Suppl 2:187-90.

SUZUKI H, HIBI T, AND B. J MARSHALL. 2007. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. J Gastroenterology 42:1-15.

SUZUKI H, T. NISHIZAW.A, ANDT. HIBI. 2010. *Helicobacter pylori* eradication therapy. Future Microbiol. 5: 639–648

TANKOVIC J, LAMARQUE D, LASCOLS C, SOUSSY C. J, AND J. C DELCHIER. 2001.Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* has a major impact on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. Pathol Biol (Paris). 49(7):528-33.

TANKOVIC J, CHAUMETTE-PLANCKAERT M. T, DEFORGES L, LAUNAY N, LE GLAUNEC J. M, SOUSSY C.J, AND J. C DELCHIER. 2007.Routine use of real-time PCR for detection of *Helicobacter pylori* and of clarithromycin resistance mutations. Gastroenterology Clin Biol. 2007 31(10):792-5.

TAYLOR D. E, GE Z, PURYCH D , LO T, AND K HIRATSUKA. 1997. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 41 (12): 2621-2628.

TENSON T, AND M EHRENBERG. 2002. Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. Cell 108:591-594.

TENSON T, LOVMARM, AND M. EHRENBERG. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. J Mol Biol 330:1005-1014.

TORACCHIO S, ACETO G. M, MARIANI-COSTANTINI R, BATTISTA P, AND L MARZIO. 2004. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. Helicobacter_ 9(5):396-399.

TORO C, GARCÍA J, ALARCÓN T, BAQUERO M. 2003. Association among anti-CagA antibody detection, antibiotic susceptibility, and peptic ulcer in patients with *Helicobacter*

pylori infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21:137-141.

TRESPALACIOS A. A, OTERO R. W, AND R. M MERCADO. 2010. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 25(1): 31-38.

TSENG Y. S, WU D. C, CHANG C. Y, KUO C. H, YANG Y. C, JAN C. M, SU Y. C, KUO F. C, AND L: L CHANG. 2009. Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Invest*. 2009 39(9):807-812.

TSUDA M, KARITAM, AND T NAKAZAWA. 1993. Genetic transformation in *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol*. 37: 85-89.

UNEMO M, ASPHOLM-HURTIG M, ILVER D, BERGSTROM J, BOREN T, DANIELSSON D AND S TENEBERG. 2005. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 280:15390-15397.

VALLEJOS M. C, GARRIDO O. L, CÁCERES L. D, MADRID A. M, DEFILIPPI C, DEFILIPPI C, AND H. A TOLEDO. 2007. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. *Rev. méd. Chile* 135(3): 287-293.

VAN DOORN L. J, SCHNEEBERGER P. M, NOUHAN N, PLAISIER A. P, QUINT W. G. AND W. A DE BOER. 2000. Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut* 46:321-326.

VAN DOORN L. J, GLUPCZYNSKI Y, KUSTERS J. G, MEGRAUD F, MIDOLO P, MAGGI-SOLCA N, QUEIROZ D. M, NOUHAN N, STET E, AND W. G QUINT. 2001. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1500-1504.

VAKIL N, AND F MEGRAUD. 2007. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*: 133 : 985-100.

VELA F. F AND J. M.B VITOR. 2010. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas?. *International Journal of Food Microbiology*: 13(8): 1-12

VERSALOVIC J, OSATO M. S, SPAKOVSKY K, DORE M. P, REDDY R, STONE G. G, SHORTRIDGE D, FLAMM R. K, TANAKA S.K, AND D. Y GRAHAM. 1997. Point

mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J. Antimicrob. Chemother. 40 (2): 283-286.

XUAN S. H, ZHOU Y. G, SHAO B, CUI Y. L, LI J, YIN H. B, SONG X. P, CONG H, JING F. X, JIN Q. H, WANG H. M, AND J ZHOU . 2009. Enzymic colorimetry-based DNA chip: rapid and accurate assay for detecting mutations for clarithromycin resistance in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 58(Pt 11):1443-1448.

YAKOUB J , ABID S , ABBAS Z, AND S. N JAFRI. 2010. Antibiotic susceptibility patterns of *Helicobacter pylori* and triple therapy in a high-prevalence area. Br J Biomed Sci 67(4):197-201

YAMAOKA Y. 2008 Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. World J Gastroenterology. 14: 4265 –4272.

YANG P , ZHOU Y, CHEN B, WAN H-W, JIA G-Q, BAI H-L, AND X-T WU. 2009. Overweight, obesity and gastric cancer risk: Results from a meta-analysis of cohort studies. European journal of cancer 45 : 2867 –2873.

YEPES C. A, RODRÍGUEZ V. A, RUIZ M. Á, AND B ARIZA. 2008. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. Acta Médica Colombiana, 33, (1): 11-14

YONATH A. 2005. Antibiotics Targeting Ribosomes: Resistance, Selectivity, Synergism, and Cellular Regulation. Annu Rev Biochem 74:649-679.

WALSH C. 2003. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, Washington, DC (p. 335).

WHARY M. T, SUNDINA N, BRAVO L. E, CORREA P, QUINONES F, CARO F, AND J.G FOX. 2005. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. Cancer Epidemiol Bio markers Prev 14:1464-9.

WIRH H, YANG M, SANABRIA-VALENTIN E, BERG D, DUBOIS A AND M.J BLASER. 2006. Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. FASEB J. 20: 1534 – 1536.

WONG BC, WANG W, BERG D, FUNG F, WONG K. 2001. High prevalence of mixed infections by *Helicobacter pylori* in Hong Kong: metronidazole sensitivity and overall genotype Aliment Pharmacol Ther 15(4):493-503.

WONG C. S, CHIA C. F, LEE H. C, WEI P. L, MA H. P, TSAI S. H, WU C. H, AND K. W TAM. 2012. Eradication of *Helicobacter*

pylori for prevention of ulcer recurrence after simple closure of perforated peptic ulcer: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Surg Res. 2012 Nov 9. pii: S0022-4804(12)00966-3. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.046. [Epub ahead of print]

WU W, YANG Y, AND G SUN. 2012. Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. Gastroenterology Res Pract. Published online 2012 July 5. doi: 10.1155/2012/723183.

WU M. S, CHEN C. J, AND J. T LIN. 2005. Host environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development to new approaches to prevent and treat gastric cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14:1878-82.

ZSCHAUSCH HC, HAN SR, MEYER HG, AND M. J. MAEURER . 2002. No association between *Helicobacter pylori* genotypes and antibiotic resistance phenotypes within families. Helicobacter. 7(6):364-6.

Anexo A. Pruebas de identificación para *H. pylori*

Identificación de *Helicobacter pylori*.

A nivel macroscópico se identificaron colonias pequeñas translúcidas, no hemolíticas, convexas a manera de gotas de rocío a las que se les realizó las siguientes pruebas de identificación:

Prueba de oxidasa:

Se extendió con un ansa (plástica) de argolla un inoculó de aislado de *H. pylori* sobre una tira de oxidasa (Oxoid®). Se observó la formación de un complejo púrpura, que indicó reacción positiva (figura 1). Las bacterias que contienen esta enzima catalizan rápidamente la oxidación de la N- dimetil-p-fenilendiamina producto coloreado en presencia de oxígeno (Dorado et al 2004)

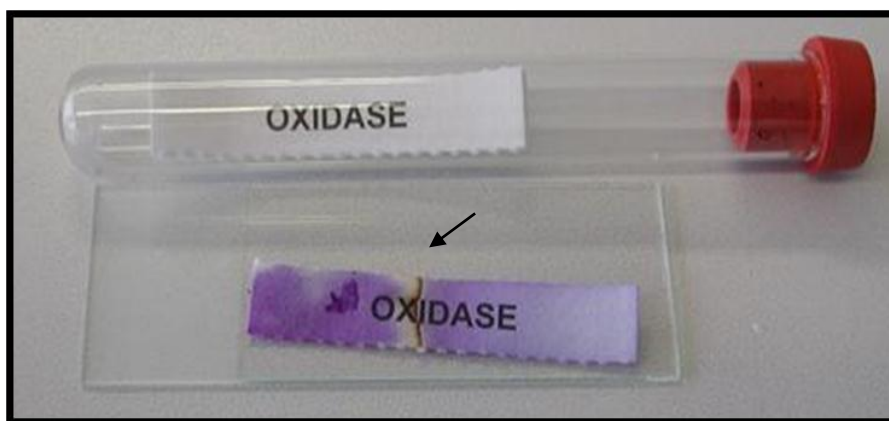


Figura 1. Prueba de oxidasa positiva para aislados de *H. pylori*. Se observa la coloración violeta, resultado positivo para actividad oxidasa.

Prueba de catalasa:

Se colocó un inoculó del aislado de *H. pylori* en lámina porta-objeto estéril y se adicionó dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10% (Carlo Erba ®). Se interpretó como positiva la inmediata formación de burbujas producida por la liberación de oxígeno y producción de agua a partir de peróxido de hidrógeno, reacción catalizada por la enzima catalasa de *H. pylori* (figura 2).

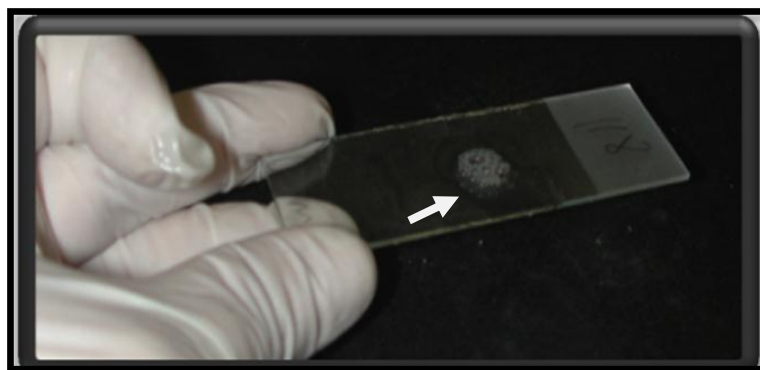


Figura 2. Prueba de Catalasa positiva para aislados de *H. pylori*. Se observa la formación de burbujas en presencia de peróxido de hidrogeno y cepas de *H. pylori*.

Prueba de detección de ureasa

Del cultivo de *H. pylori* se tomó un inóculo con un ansa de transferencia y se le adicionó a un tubo Nunc con 1 mL de solución de urea (Promega®) al 10% con rojo de fenol (Carlo Erba®) como indicador de pH. Interpretadas cada minuto durante los primeros cinco minutos, y una lectura final a los 20 minutos. Los resultados fueron considerados como positivos, cuando las muestras que se tornaron de color fucsia durante la prueba (figura 3). La reacción se presenta por la acción de la ureasa que hidrolizará la urea para convertirla en amonio y en dióxido de carbono. Esta reacción es alcalina, por lo tanto modificará el color del indicador rojo de fenol añadido, que cambiará de amarillo a fucsia, señalando un resultado positivo y negativo si permanece del mismo color. $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ureasa $2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$ Urea Amonio.



Figura 3. Prueba de ureasa positiva para aislados de *H. pylori*. Se observa el cambio de

coloración de amarillo a fucsia del rojo fenol, generado por la alcalinización del medio como resultado de la degradación de la Urea por la enzima ureasa de *H. pylori*.

Coloración de Gram

Esta coloración se realizó posteriormente a la fijación del extendido del inóculo aislado de *H. pylori*, y tinción con los reactivos: violeta de genciana, lugol, alcohol acetona y fuchina básica. Posterior a esta coloración los extendidos fueron leídos por microscopia (microscopio Olympus binocular) con objetivo 40X y 100X (figura 4). Los resultados de cada aislado fueron registrados en los formatos de cultivo. El control de calidad de la coloración de Gram se realizó semanalmente, usando cepas control ATCC43504 de *H.pylori* como control positivo.

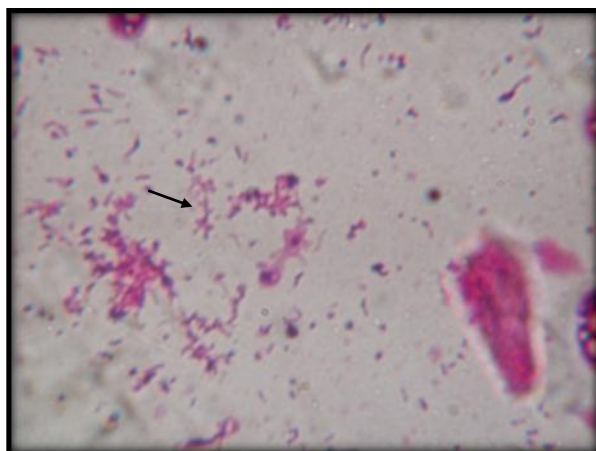


Figura 4. Coloración de Gram (100X), la flecha señala la presencia de bacilos en forma de espiral, fenotipo de la bacteria; la coloración de Gram al igual que, las pruebas de oxidasa, ureasa y catalasa, se emplean en la identificación de *H.pylori*

Anexo B. Estudios de susceptibilidad de *H.pylori* a amoxicilina y claritromicina 2000-2013

En este anexo se enumeran las investigaciones disponibles en pudmed, que evaluaron la susceptibilidad a amoxicilina y claritromicina en *H.pylori* en el periodo entre el 2010 a 2013.

Estudio	país	Cla	Amox	año	Método de análisis de susceptibilidad
América del norte					
Duck et al 2004	EEUU	12,9	0,9	2004	Dilución en agar
Latinoamérica					
Chihu et al 2005	México	2	0	2005	E-test
Vega et al 2010	Argentina	27,8	NA	2010	Dilución en agar
Lang, y García .2004	Costa Rica	5,3	5,3	2004	E-test y disco de difusión
Llanes et al 2010.	Cuba	10	Na	2010	Dilución en agar
Debets-Ossenkopp et al 2003.	Ecuador	10	na	2003	E-Test
Torres-Debat et al 2009	Uruguay	12	Na	2009	E-Test
Mendonça et al 2000.	Brasil	7	29	2000	Dilución en agar
Ogata et al 2013	Brasil	19,5	10,4	2013	Dilución en agar
Medio oriente					
Bakir et al 2009	Turquía	41,9	3,2	2009	E-test
Yakoob et al 2010	Pakistán	33	2	2010	E-test
Europa					
Hooton et al 2006	Irlanda	8,9	NA	2006	E-test
Francavilla et al 2010	Italia	11,1	NA	2010	E-test
Tankovic et al 2001	Francia	18,7	0	2001	E-test
Tankovic et al 2007	Francia	30	Na	2007	Dilución en agar
Lascols et al 2003	Francia	18,5	NA	2003	etest
Ferrero et al 2000	España	9,7	0	2000	E-Test
Boyanova et al 2010	Bulgaria	18	0	2010	E-Test
Dzierzanowska-Fangrat et al 2005	Polonia	28	NA	2005	E-Test
Raymond et al 2007	Francia	23	NA	2007	Dilución en agar
Wueppenhorst et al 2009	Alemania	0,9	0	2009	E-Test
Kalach et al 2007	Francia	22,8	0	2007	Dilución en agar
Boyanova et al 2008.	Bulgaria	4,4	0,9	2008	E-Test
Asia					
Chen et al 2004	China	14,8	NA	2004	E-test
Zhenget al 2001	China	13,5	NA	2001	E-test)
Eun et al 2003	Corea	5,4	0	2003	E-test)
Yang et al 2001	China	18	NA	2001	E-test)
Hansomburana et al 2012.	Tailandia	13,8	21,3	2012	E-test

Rozynek et al 2002	Polonia	19,3	0,4	2002	E-test
Perez et al2002.	Japón	11	0,3	2002	Dilución en agar
Hao et al 2004	China	23,3	0	2004	E-Test
Cheng et al 2012	Taiwán	9,7	0	2012	E-Test
Kato et al 2002.	JAPON	29	0	2002	Dilución en agar
Liu et al 2011	China	84,9	0	2011	E-Test
Woo et al 2009	Corea del sur	16,7	0	2009	E-Test
Kim et al 2001	Corea	5,9	0	2001	Dilución en agar
Africa					
Seck et al 2013	Senegal	1	0	2013	E-Test

En la tabla Cla = Claritromicina , Amox = Amoxicilina y NA: no analizado

Anexo C. Investigaciones de mutaciones en el gen *23S rRNA* de *H. pylori* y resistencia a claritromicina periodo 2000-2013.

En este anexo se enumeran las investigaciones disponibles en pudmed, que evaluaron las mutaciones en el gen *23S rRNA* en *H.pylori* asociadas a la resistencia a claritromicina en el periodo entre el 2010 a 2013.

Autor	País	Año	Método	Población n	Mutación
Alvares et al 2009	Colombia	2009	difusión en disco - RFLp		A2143G or A2142G
ISAZA et al 2007	Colombia	2007	PCR-RFLP, prueba rápida de ureasa.		1/4= A2142G , 3/4 = A2143G
Barile et al 2010	Brasil	2010	PCR -Secuenciación	49 aislados	76% de los aislados resistentes A2142G (3.3%), T2182C (12.9%), G2224A (6.45%), T2215C (61.3%), A2192G (3.3%), G2204C (6.4%) y T2221C (6.4%)
Chihu et al 2005	México	2005	prueba Epsilonometer , PRC-RFLP	49 aislados	1/2= A2142G y 1/2= A2143G/T2182C
Garrido Toledo et al 2007	Chile	2007	Dilución agar PCR- RFLP y secuenciación.	50 aislados	C2147G, G1939A, T1942C y A2142G
Chen et al 2004	China	2004	E -Test PCR-RFLP .	108 aislados	13/116 =A2144G 3/16 = A2143G
Yan et al 2004	China	2009	E -Test PCR-RFLP .	39 Aislados	13/39 = A2143G y 14/39=A2144G
Zheng et al 2001	China	2001	E -Test PCR-RFLP	89 pacientes	12/12 =A2143G
Hao et al 2004	China	2004	método de dilución en agar -PCR-secuenciación	30 aislados	1/7= T2289C, 1/7= g2224A/ T2289C, 1/7= g2224A/ T2289C/C2245T
Yang et al 2001	China	2001	Etest-PCR-RFLP	245 niños	10/12= A2144G , 1/12=A2143G y 1/2 A2143G/A2144G
Hu et al 2008	China	2008	dilución agar / PCR secuenciación	133 aislados	T2182C, A2143G/ T2182C, A2143G T2182C C2227T
Liu et al 2008	China	2008	PCR-RFLp y secuenciación	770 aislados	AACC → GAAG (2081-2084) y AAGGG → CTTCA (2222-2226)
Hoh et al 2010	China	2010	E-Test, PCR-RFLP	107 aislados	A2142G y A2143G
Hwang et al 2010	Korea	2010	Método de dilución en agar -PCR-secuenciación	222 aislados	6/26 = A2143G T2183C y A2223G presentes en aislados resistentes y sensibles
Eun et al 2003	Korea	2003	método de dilución en agar -PCR-RFLP - secuenciación	224 pacientes entre junio 1996 y marzo del 2000	6/12= A2144G y 3/12 A2182C
Kim et al 2008	Japón	2008	PCR -secuenciación	21 aislados con resistencia primaria y 64 aislados con resistencia secundaria	15/21=A2143G 6/21=T2182C en aislados con resistencia primaria , y 5/64=A2143G 5/64=T2182C , 45/64= A2143G/ T2182C, 4/34=A2143G/ T2182C/T2190C, 3/64= A2143G /T2182C/C2195T y 2/64 =A2143G/T2182C/A2223G en aislados de <i>H.pylori</i> con resistencia secundaria
Rimbara et al 2007	Japón	2007		67 aislados	A2142G y A2143G
Rimbara et al 2007	Japón	2007	Dilución en agar - pcr- secuenciación	84 aislados	5/67 =a2142g Y 62/37=a2143g t2182c, G2223A,C2244T, T2288C EN AISLADOS RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES

Kato et al 2002	Japón	2002	Dilución en agar, PCR-RFLP	99 aislados	A2144G
Matsumura et al 2001	Japón	2001	dilución en agar y RT-PCR	186 pacientes	A2144G
Woo et al 2009	Korea del sur	2009	DPO-Based Multiplex, PCR y secuenciación	212 aislados	3 =A2143G
Hansomburana et al 2012	Tailandia	2012	E-Testy RT-PCR	200 pacientes entre junio 2006 y septiembre del 2008	4/27= A2142G y 2/27= G2111A/A2115G/A2144G
Mahachai et al 2011	Tailandia	2011	PCR y secuenciación	151 aislados	A2143G y A2142G
Yakoob et al 2010	Pakistán	2010	E -Test PCR-RFLP	92 pacientes	20/30= A2142G , 12/30 A2143G y 5/30 =A2142C
Hooton et al 2006	Pakistán	2006	prueba Epsilometro-PCR-secuenciación	147 pacientes	NA
Alfàresi et al 2010	Emiratos Árabes	2010	prueba Epsilometro-PCR-secuenciación	100 biopsias gástricas	2/5 = A2142G y 3/5= A2143G
Ahmad et al 2009	Emiratos Árabes	2009	E-Test y secuenciación	187 aislados	A2142G, A2143G/ T2182C 1, A2143G y A2142G/ T2182C
Kargar et al 2012	Irán	2012	Rt-PCR	200 pacientes	3 =A2144G (1.8%), 13 = A2143G (7.9%), 7 =A2143C (4.3%) 15= A2142G (9.15%)
Ahmad et al 2009	Turquía	2009	E-Test, PCR-RFLP	180 aislados	A2142G , A2143G y T2182C
Momynaliev et al 2005	Rusia	2005	MALDI-TOF		A2144G
Rozynek et al 2002	Polonia	2002	método de dilución en agar y E-Test, PCR-RFLP	259 aislados de <i>H. pylori</i> , entre 1996-2000	50 = A2143G
Dzierzanowska-Fangrat et al 2001	Polonia	2001	E-Test y PCR-RFLP	biopsias gástricas de 45 niños y 53 adolescentes	16/23= A2143G, 4/23= A2142G, 2/23=A2142C, 1/23=T2182C Y 1/26=A2142C/C1953T
Francavilla et al 2010	Italia	2010	RT-PCR	168 biopsias de niños	16 /32= A2143G y 8/36= A2142G/ A2142C
Agudo et al 2010	España	2010	E-Testy PCR secuenciación	117 aislados	A2143G 85.3%, A2142G 8.8% y T2182C 5.9%
Agudo et al 2010	España	2010		106 biopsias	A2143 y A2142g
Agudo et al 2011	España	2011	E- Test , PCR-RFLP y secuenciación	118 aislados de h	A 2143 G ,T 2182 C, A 2143 G + T 2182 C
Piana et al 2002	Italia	2002	E-Test y RFLP		A2143G y A2144G
Fontana et al 2002	Italia	2002	E-Test, PCR y secuenciación	230 aislados	T2717C
WOLLE et al 2002	Alemania	2002	E-Testy PCR-RFLP	1644 aislados de entre 1995 y 2000	19/36= A2143G y 12/36= A2142G
Van Doorn et al 2001	Alemania	2001	E-Test , pcr lipa	299 aislados	A2142G A2142C A2143G
Moder et al 2007	Alemania	2007	E -Test, piro secuenciación	81 biopsias gástrica	A2142G/C, A2143G, T2182C no asociada a resistencia
Raymond et al 2007	Francia	2007	Dilucionn agar PCR Y RFLP secuenciación	217 aislados	A2143G y A2142G
Seck et al 2013	Senegal	2013	E-Testy PCR-Scorpion	108 aislados	A2143G

En la tabla Anexo C, la palabra aislados se refieren a aislados de *H. pylori*, en las casillas método; se muestran las metodologías de análisis de susceptibilidad a claritromicina, y la metodología empleada para la caracterización de la mutaciones en el gen *23SrRNA*, la letra *n* señala el número de muestras ya sean aislados o pacientes evaluados, y mutacion a la descripción de lo encontrado en el estudio referenciado.